

Die Rolle des KRAS-Mutationsstatus beim fortgeschrittenen
Pankreaskarzinom: Differenzierung zwischen prognostischem
und prädiktivem Stellenwert

Sibylle Natalia Rietzler

Aus der
Medizinischen Klinik und Poliklinik III
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. Dr. Michael von Bergwelt

Die Rolle des KRAS-Mutationsstatus beim fortgeschrittenen
Pankreaskarzinom:
Differenzierung zwischen prognostischem und prädiktivem Stellenwert

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Sibylle Natalia Rietzler, geb. Bächmann
aus Nürnberg
2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Volker Heinemann

Mitberichterstatter: PD Dr. med. Susanna Müller,
Prof. Dr. med. Christoph Clemm

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. med. Stefan Böck,
Dr. med. Michael Haas,
Dr. med. Steffen Ormanns

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 25.10.2018

Den Menschen gewidmet, die mich immer unterstützen,
meinen Eltern Barbara und Dr. med. Arthur Bächmann
und meinem Ehemann Lasse Rietzler.

Einleitung	1
1. Das Pankreaskarzinom	1
1.1. Epidemiologie und Ätiologie	1
1.2. Ursprungsgewebe und Lokalisation	2
1.3. Tumorstadien, - klassifikation und Therapieoptionen	2
1.4. Pathogenese	4
2. KRAS und der EGFR-Signaltransduktionsweg	5
3. Klinische Parameter und Biomarker: Prognostische und prädiktive Faktoren	7
4. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	9
Patientenmaterial und Methoden	11
1. Patientenkollektiv	11
1.1. Ein- und Ausschlusskriterien	11
1.2. Herkunft des Kollektivs	11
2. Untersuchungsmaterial	13
2.1. Herstellung von Paraffinblöcken	13
2.1.1. Fixierung	13
2.1.2. Einbettung	13
2.2. Bearbeitung der Paraffinblöcke am Rotationsmikrotom	14
2.2.1. Arbeitsweise am Mikrotom	14
2.2.2. Weitere Behandlung der Schnittpräparate	15
2.2.3. Darstellung möglicher Komplikationen	15
2.2.4. Übersicht über Materialien und Geräte	16
3. DNA-Extraktion	16
3.1. Zieldarstellung der angewandten Methode	16
3.2. Übersicht über Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Geräte	17
3.3. Vorbereitung des Untersuchungsmaterials	18
3.3.1. Diagnostizierung des Tumorareals	18
3.3.2. Entparaffinierung der Schnittpräparate	18
3.4. Materialgewinn und Proteolyse	19
3.4.1. DNA-Gewinnung	19
3.4.2. Proteolyse	20

3.5.	DNA-Isolation am QIAcube	20
3.5.1.	Ablauf und Prinzipdarstellung	21
3.5.2.	Beladung des QIAcube	21
4.	Grundlagen zur DNA	22
4.1.	Aufbau und Bestandteile	22
4.2.	Chemische Bindungsreaktionen	23
4.3.	Funktion der DNA-Polymerase	23
5.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	23
5.1.	Allgemeines Funktionsprinzip und Zielsetzung	23
5.2.	PCR zur Darstellung des KRAS-Mutationsstatus:	
	KRAS Exon 2, Exon 3 sowie Exon 4	24
5.2.1.	Vorbereitung	24
5.2.2.	Pipettierungsschema Mastermix	26
5.2.3.	Amplifikation mittels Thermocycler	26
5.2.4.	Qualitätskontrolle	27
5.2.5.	Übersicht über Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Geräte	27
6.	DNA-Sequenzierung	28
6.1.	Definition und Überblick	28
6.2.	Pyrosequenzierung zur Darstellung des KRAS-Mutationsstatus:	
	KRAS Exon 2, Exon 3 sowie Exon 4	29
6.2.1.	Allgemeines Funktionsprinzip	29
6.2.2.	Vorbereitung	29
6.2.3.	Sequenzierung am Pyrosequenzer	31
6.2.4.	Pyrogrammauswertung	33
	6.2.4.1. Exon 2	34
	6.2.4.2. Exon 3	36
	6.2.4.3. Exon 4, p.117	38
	6.2.4.4. Exon 4, p.146	39
6.2.5.	Übersicht über Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Geräte	41
Ergebnisse		43
1.	Patientenkollektiv	43
1.1.	Allgemeine Patientencharakteristika	43
1.2.	Tumor-spezifische Patientencharakteristika sowie Therapieoptionen	44
1.3.	Häufigkeiten und Lokalisation der Fernmetastasen	46
1.4.	Häufigkeiten der palliativen Chemotherapie-Schemata	49

2.	KRAS-Mutationsstatus	50
2.1.	Übersicht und Häufigkeiten der KRAS-Mutationen	50
2.1.1.	Exon 2, Codon 12/13	51
2.1.2.	Exon 3, Codon 59/61	53
2.1.3.	Exon 4, Codon 117/146	53
3.	Univariate Analysen	54
3.1.	Korrelation klinischer Parameter mit Gesamtüberleben	54
3.1.1.	Geschlecht	54
3.1.2.	Alter	55
3.1.3.	Karnofsky Performance-Status	56
3.1.4.	CA19-9 im Serum	56
3.1.5.	Tumorstadium	57
3.1.6.	Metastasierung	58
3.2.	Korrelation des KRAS-Mutationsstatus mit dem Gesamtüberleben	60
3.2.1.	Mutation in Exon 2	60
3.2.2.	Subtypisierung der Punktmutationen in Exon 2	61
3.2.3.	Mutation in Exon 3	64
3.2.4.	Mutation in Exon 2 und 3	64
3.2.5.	Mutation in Exon 2 oder 3	65
4.	Korrelation KRAS-Mutationsstatus mit klinischen Parametern	66
4.1.	KRAS-Mutationsstatus und Karnofsky Performance-Status	66
4.2.	KRAS-Mutationsstatus und Tumorstadium	67
4.3.	KRAS-Mutationsstatus und Alter	67
4.4.	KRAS-Mutationsstatus und CA19-9 im Serum	68

Diskussion **69**

1.	Stellenwert des KRAS-Mutationsstatus bei anderen Tumorentitäten	69
2.	Die Rolle des KRAS-Mutationsstatus beim fortgeschrittenen Pankreaskarzinom	70
2.1.	Häufigkeiten des Auftretens von Mutationen im KRAS-Gen	70
2.2.	Analysierte Gensequenzen: Exon 2,3 und 4 sowie Subtypisierung	71
2.3.	Prognostischer Stellenwert	73
2.4.	Prädiktive Bedeutung für Erlotinib	74
3.	Prognostische Rolle weiterer klinischer sowie tumor-spezifischer Parameter und Einfluss auf die Tumorbilogie	75
4.	Studienlimitationen	76
5.	Die Rolle des NRAS-Mutationsstatus beim fortgeschrittenen Pankreaskarzinom	76

Zusammenfassung	78
------------------------	-----------

Anhang	79
---------------	-----------

1. Abbildungen	79
2. Tabellen	81
3. Eigene Veröffentlichungen und Posterpräsentation	83

Literaturverzeichnis	85
-----------------------------	-----------

Internetquellenverzeichnis	91
-----------------------------------	-----------

Danksagung	92
-------------------	-----------

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bezeichnung
AKT	Serin/ Threonin spezifische Proteinkinase
ADM	Azinäre duktale Metaplasie
AMP/ ADP	Adenosin-Monophosphat/ Adenosin-Diphosphat
BMI	Body-Maß-Index
BRCA 1/ 2	Breast Cancer 1/ 2
Cap	Capecitabin
CDKN 2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, p16
CRC	Colorectal Cancer
CRP	C-reaktives Protein
DNA	Desoxyribonucleic acid (engl.), Desoxyribonukleinsäure
dNTP/ dNMP/ dNDP	Desoxynukleotidtriphosphat/ -mono/ -diphosphat
ED	Erstdiagnose
EGF	Epithelial growth factor
EGFR	Epithelial growth factor receptor
ERK	Extracellular-signal regulated kinase
FOLFIRINOX	Kombinationstherapie aus: Oxaliplatin, Irinotecan, Folinsäure und 5-Flourouracil
GDP/ GTP	Guanosindiphosphat/ -triphosphat
GEF	Guanosin exchange factor
GEM	Gemcitabin
GTPase	GTP spaltendes Enzym
HE	Hämatoxylin-Eosin
hENT1	Human equilibrative nucleoside transporter 1
Her2/neu	human epidermal growth factor receptor 2, erb-B2, c-erbB2

Abkürzung	Bezeichnung
HR (95% CI)	Hazard Ratio (95% Konfidenzintervall)
HRAS	Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog, transforming protein p21
KPS	Karnofsky Performance-Status, Karnofsky-Index
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog, Vi-Ki-ras 2
NRAS	Neuroblastoma rat sarcoma viral oncogene homolog
NSCLC	Non small cell lung cancer, nicht kleinzelliges Lungenkarzinom
OS	overall survival, Gesamtüberleben
p53	Tumor protein 53
PanIN	Pankreatische Intraepitheliale Neoplasie
PCA	Pankreaskarzinom
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
PDAC	Pankreatisches duktales Adenokarzinom
PFI	Progressions freies Intervall
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
PPi	Pyrophosphat
PTEN	Phosphat und Tensin homologer Tumorsuppressor
p-Wert	Überschreitungswahrscheinlichkeit, Signifikanzwert p = probability = Wahrscheinlichkeit
QIAcube	Analyseautomat der Firma QIAGEN zur DNA-Isolation
RNA	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
SMAD4	Mothers against decapentaplegic homolog 4, SMAD family member n°4
SPARC	Secret protein acidic and rich in cysteine
Taq-Polymerase	thermostabile Polymerase, Isolation aus Thermus aquaticus (Taq);
TTP	Time to progression
UICC	Union International Contre le Cancer

Abkürzung	Bezeichnung
WHO	World Health Organisation
WT	Wildtyp

Einleitung

1. Das Pankreaskarzinom

1.1. Epidemiologie und Ätiologie

Das Pankreaskarzinom (PCA) reiht sich weltweit in die Liste der höchst malignen Erkrankungen ein und verläuft in den meisten Fällen tödlich [1]. Die Erkrankung steht mit steigender Inzidenz bei Männern auf Platz zehn und bei Frauen auf Platz sechs der häufigsten Krebserkrankungen, wobei in den westlichen Industrienationen Männer im Vergleich um bis zu 50 % häufiger betroffen sind. Insgesamt stellt das Pankreaskarzinom bei beiden Geschlechtern die vierthäufigste krebsbedingte Todesursache dar [2]. Unter den Tumoren des Verdauungstraktes reiht sich das PCA nach dem Kolon- und Magenkarzinom an dritter Stelle ein [3].

Nicht nur auf Grund der meist fehlenden Frühsymptomatik und der relativ hohen Therapieresistenz dieser Tumorentität, sondern auch bedingt durch eine besondere genetische Heterogenität, geht die Erkrankung mit einer äußerst schlechten Prognose einher. Dies führt, bei in etwa identischer Inzidenz und Mortalität dazu, dass das Pankreaskarzinom die Krebserkrankung mit der niedrigsten Überlebensrate darstellt [2, 4, 5]. Die späte Diagnosestellung hat zur Folge, dass das PCA leider sehr oft in einem schon lokal fortgeschrittenen oder metastasierten Stadium vorliegt. Diese Patienten zeigen ein durchschnittliches Überleben von nur 6 bis 12, bzw. 3 bis 6 Monaten [6]. Für beide Geschlechter lässt sich eine 5-Jahres-Überlebensrate von nur zwischen < 3,5 und 8 % prognostizieren [2, 5-8]. Bleibt der Tumor unbehandelt, oder fehlt eine effektiv wirksame Therapiemöglichkeit, so liegt das mediane Überleben beim metastasierten PCA bei nur 3 bis 4 Monaten [9].

Im Allgemeinen ist die Ätiologie des Pankreaskarzinoms multifaktoriell, jedoch noch nicht vollständig geklärt. Als gesicherte disponierende Risikofaktoren für die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms gelten der Einfluss von Nikotin, Alkoholabusus, Adipositas bei einem Body-Mass-Index (BMI) von $\geq 30 \text{ kg/m}^2$, Diabetes mellitus und eine langjährig bestehende, chronische Pankreatitis. Im Fall einer positiven Familienanamnese zeigt sich ebenfalls ein statistisch höheres Erkrankungsrisiko, wobei hier noch unklar ist, ob dem als Ursprung eine gemeinsame genetische Prädisposition oder ein vergleichbarer Lebensstil zu Grunde liegt. Ferner kommen auch hereditäre Syndrome mit einem erhöhten Neoplasierisiko vor [2, 3, 6, 10].

Des Weiteren spielen bei der Entstehung eines malignen Tumors des Pankreasgewebes auch genetische Faktoren eine große Rolle. Die molekulare Pathogenese schließt hierbei schrittweise eine Akkumulation verschiedener Genmutationen in Onkogenen, Funktionsverluste von Tumorsuppressorgenen und die Bildung von genetischer Überexpressionen mit ein [11] (► 1.4. Pathogenese).

1.2. Ursprungsgewebe und Lokalisation

Aus den drüsenbildenden Hauptfunktionen des Pankreasgewebes – der endokrinen Hormon bildenden (Insulin, Glukagon, Somatostatin) und exokrinen Verdauungsenzyme bildenden Funktion (Bikarbonat, Amylase, Lipase u.a.) – lassen sich zwei mögliche Ursprungszelltypen im Rahmen der Karzinom-Entstehung ableiten. Mit bis zu 90 % zeigt sich vorwiegend das von den exokrinen Anteilen ausgehende, pankreatische duktale Adenokarzinom (PDAC). Diese sind überwiegend (60 – 70 %) im Pankreaskopf lokalisiert [12, 13]. Histologisch zeigen diese Tumoren invasiv wachsende, drüsenbildende, epitheliale Formationen mit ausgeprägter desmoplastischer, peritumoraler Stroma-Reaktion [14, 15]. Seltener treten maligne Tumore auf, die vom Inselapparat, dem endokrinen Anteil des Pankreas, ausgehen. Verglichen mit dem PDAC weisen diese eine deutlich bessere Prognose auf [2] und sind klinisch sowie biologisch den neuroendokrinen Tumoren zuzuordnen [15]. Auf Grund der Dominanz des pankreatischen dukталen Adenokarzinoms beziehen sich die folgenden Angaben auf diese Tumorentität.

1.3. Tumorstadien, - klassifikation und Therapieoptionen

Eine Klassifizierung und damit Prognoseeinschätzung sowie Richtlinie zur Therapieplanung des PDAC erfolgt mittels der TNM-Klassifikation für maligne Tumoren nach den Vorgaben der *Union Internationale Contre le Cancer* (UICC). Hierbei wird die Tumorausdehnung im Pankreasgewebe sowie die Tiefeninfiltration des Tumors in angrenzende Gewebestrukturen (T, Ausdehnung Primärtumor), der Tumorbefall regionaler Lymphknoten (regionäre Lymphknotenmetastasen, N) und das Vorhandensein von Fernmetastasen (M) beurteilt [3, 16]. Verfahren zur Bestimmung der klinischen T-, N-, und M-Kategorien (cTNM) beim Pankreaskarzinom sind die klinische Untersuchung, bildgebende Verfahren und die chirurgische Exploration. Die endgültige postoperative Klassifikation (pTNM) wird schließlich nach histologischer Diagnosesicherung im Rahmen der pathologischen Diagnostik erstellt [16]. Jedem vom Tumor befallenen Gewebeabschnitt wird zusätzlich ein histopathologisches Grading (G, Differenzierungsgrad) zugeordnet, das nach zytomorphologischen Kriterien, dem Grad der Entdifferenzierung im Vergleich zum Ursprungsgewebe

und durch die Bestimmung der Mitoserate erfolgt. Die pTNM sowie das Grading gehen neben weiteren Faktoren wie zum Beispiel dem postoperativen Resektionsstatus (R-Status, Residualtumor), in die UICC-Stadien ein.

Die folgenden Tabellen zeigen die TNM-Klassifikation des Pankreaskarzinoms (► Abb. 1) und die Einteilung des histopathologischen Gradings (► Abb. 2).

Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tcis	Carcinoma in situ
T1	Tumor 2cm oder weniger in größter Ausdehnung
T1a	Tumor 0,5 cm oder weniger in größter Ausdehnung
T1b	Tumor 0,5 cm aber weniger als 1 cm in größter Ausdehnung
T1c	Tumor mehr als 1 cm aber nicht mehr als 2 cm in größter Ausdehnung
T2	Tumor mehr als 2cm aber weniger als 4 cm in größter Ausdehnung
T3	Tumor mehr als 4 cm in größter Ausdehnung
T4	Infiltration Truncus coeliacus, A. mesenterica superior u./o. A. hepatica communis
Nx/N0/N1/N2	Nicht beurteilbar/keine/ Metastasen in 1-3 regionären LK/ Metastasen in 4 oder mehr regionären LK
M0/M1	Nicht beurteilbar/keine/ Fernmetastasen

Abb. 1: TNM-Klassifikation Pankreaskarzinom

nach: Wittekind, C., & Meyer, H.-J. (2017). TNM Klassifikation maligner Tumoren [16].

G1	Gut differenziert ; glanduläre Differenzierung, intensive Schleimproduktion, ≤ 5 Mitosen pro HPF, geringe Kernpolymorphie;
G2	Mäßig differenziert ; mittelgradig differenzierte gangartige Strukturen der tubulären Drüsen, irreguläre Schleimproduktion, 6-10 Mitosen pro HPF, mittelgradige Kernpolymorphie;
G3	Schlecht differenziert ; gering differenzierte Drüsen, evtl. mukoepidermoide und pleomorphe Strukturen, abortive Schleimproduktion, mehr als 10 Mitosen pro HPF, hochgradige Kernpolymorphie;

Abb. 2: Histopathologisches Grading

nach: Bosman F., et al, WHO Classification of Tumours of the Digestive System [13].

Die erfolgreiche Behandlung eines pankreatischen duktaalen Adenokarzinoms stellt die Medizin vor eine schwierige Aufgabe. Dabei stellt die chirurgische Resektion die einzige Möglichkeit der kurativen Therapie dar. Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose weisen allerdings nur 15 % der Patienten einen potentiell resektablen Tumor auf [17]. Viele der Betroffenen erleben trotz R0-Status im nachfolgenden Zeitraum ein Rezidiv, was die aggressive Natur des PDAC verdeutlicht [18]. Bei 80 % der Patienten jedoch ist die chirurgische Resektion bereits von Diagnosestellung an keine Therapieoption mehr. Bei ca. 60 % der Fälle muss mit einem schon metastasierten PDAC gerechnet werden, der übrige Teil weist einen noch

lokal begrenzten, aber fortgeschrittenen, bereits inoperablen Tumor auf [1, 18]. Bei diesen Patienten bezieht die Behandlung nicht nur eine Chemotherapie sowie zum Teil eine Therapie mit monoklonalen Antikörpern – wie zum Beispiel dem EGFR-Inhibitor Erlotinib – mit ein, sondern macht es ebenso erforderlich, paraneoplastische Begleitsymptome zu erkennen und frühzeitig mit einer psychologischen Betreuung der betroffenen Patienten zu beginnen [1].

Als medikamentöse Behandlung stellt eine Monotherapie mit Gemcitabin (Gem) bis zum jetzigen Zeitpunkt die Erstlinientherapie dar [19]. Gem bewirkt eine Erhöhung des Gesamtüberlebens auf 5 bis 7 Monate und zeigt eine vergleichsweise gute Verträglichkeit bei den Patienten [20]. Neben Gemcitabin als Einzel-Agens in der palliativen Chemotherapie stellen außerdem das Kombinationsschema FOLFIRINOX sowie die Konstellation Gemcitabin mit nab-Paclitaxel zugelassene Erstlinientherapie-Optionen dar, welche das Überleben der Patienten in manchen Fällen bis auf 11 Monate verbessern können [17]. Ferner zeigten zwei weitere auf Gemcitabin basierende Kombinationstherapien einen statistisch signifikanten, wenn auch klinisch nur moderaten Überlebensvorteil [21]. Diese sind eine Kombination von Gem + Erlotinib einerseits [22] sowie Gem + Capecitabin (Cap) andererseits [23].

1.4. Pathogenese

Das PDAC entwickelt sich über eine azinäre duktale Metaplasie (ADM) aus neoplastischen Vorläuferläsionen. Am häufigsten zeigt sich hierbei, dem klassischen PDAC entsprechend, eine pankreatische intraepitheliale Neoplasie (PanIN), welche je nach Stadium zunehmend zelluläre, nukleäre und molekulare sowie in höheren Stadien bereits mehrere genetische Veränderungen aufzeigt [24] (► Abb. 3).

Die Entwicklung und die Progression eines pankreatischen duktales Adenokarzinoms setzt damit die progressive Akkumulation verschiedener genetischer Veränderungen voraus. Dabei zeigen sich in bis zu > 90% der Fälle – und damit mit der höchsten Frequenz – Mutationen im onkogenen KRAS-Gen als Initiator-Mutation. Auch in geringgradigen Vorläuferläsionen lassen sich diese genetischen Veränderungen bereits nachweisen [5, 6, 25]. Daneben wird der Prozess der Tumorentwicklung und der -progression zusätzlich durch die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen wie p53, Smad4 und p16/CDKN2A hingehend beschleunigt [5, 14, 26, 27]. Auch Veränderungen im BRCA-Gen sowie die Überexpression des epithelialen Wachstumsfaktors Her2/neu kommen vor [28].

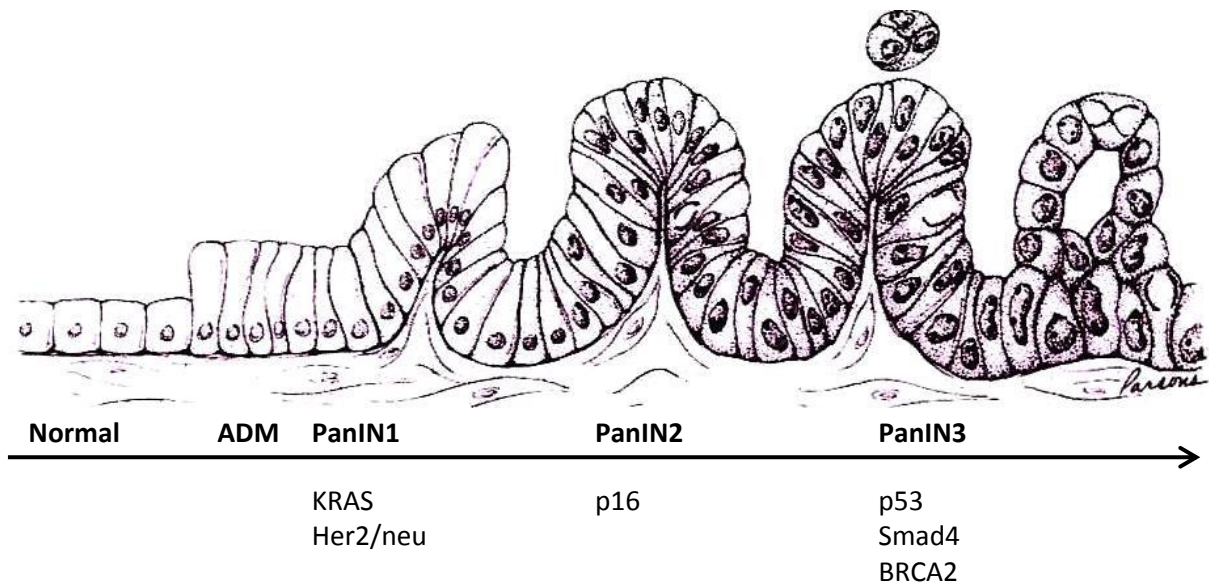


Abb. 3: Tumorprogressionsmodell Pankreaskarzinom

Modifiziert nach: Hruban, R. H., Goggins, M., Parsons, J., & Kern, S. E. (2000). Progression model for pancreatic cancer. *Clinical Cancer Research* [28].

2. KRAS und der EGFR-Signaltransduktionsweg

Es ist bekannt, dass die übersteigerte oder dauerhafte Aktivierung von EGFR-abhängigen Signaltransduktionswegen in der Karzinogenese vieler Tumorarten – so auch beim PDAC – eine wichtige Rolle spielt. Bei den malignen Tumoren des Menschen kommen Mutationen im KRAS-Gen am häufigsten beim Pankreaskarzinom vor [29, 30]. Es handelt sich hierbei um Punktmutationen, welche zumeist das Codon 12, 13 des Exon 2 betreffen [30-33]. In erster Linie tritt hier die Punktmutation c.35G>A (G12D) in Erscheinung, bei welcher Guanin zu Adenin substituiert vorliegt [8, 34].

KRAS (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (Vi-Ki-ras 2)) gehört zur Familie der RAS-Proteine. Es gibt drei humane Gene der RAS-Familie, die für die Proteine KRAS, HRAS und NRAS codieren [35]. RAS Proteine sind Guanosintriphosphat (GTP) spaltende Enzyme (Phosphorylasen), die sich im ständig wechselnden Zustand zwischen einer aktiven GTP gebundenen und einer inaktiven Guanosindiphosphat (GDP) abhängigen Form befinden. Der Übergang in das aktivierte Protein erfolgt durch Guanosin-Austausch-Faktoren (GEFs), eine Deaktivierung hingegen durch Hydrolyse [5].

Zu den drei Hauptsignalwegen an welchen KRAS beteiligt ist, zählt die *RAS-RAF-MEK-ERK-Kaskade* und der *PI3K-AKT-PTEN-Signalweg* [5] (► Abb. 4). Die Signaltransduktion ist dabei abhängig von einem komplexen Zusammenspiel vieler verschiedener intrazellulärer Moleküle und zeichnet sich durch eine entsprechende Dynamik aus. Durch die Initialisierung mittels Wachstumsfaktoren (EGF = epidermal growth factor) werden über

eine Aktivierung von Transkriptionsfaktoren die Zellproliferation, das Wachstum sowie die Differenzierung von Zellen, Apoptose und auch die Angiogenese reguliert [35-37].

Im Falle einer Mutation im KRAS-Gen entzieht sich das Protein der Inaktivierung durch die Hydrolyse und verweilt in seiner aktivierten Form. Dadurch wird eine kontinuierliche und damit übersteigerte Stimulation der Signalweiterleitung bewirkt [5, 6]. Dies wiederum hat eine Initiierung von Tumorprogression und -proliferation, Zellmigration, eine übersteigerte Transkription und schließlich auch eine beschleunigte Metastasenbildung zur Folge. Auch der Hemmung der Apoptose, sowie der Inhibition der Immunantwort kommt eine wichtige Bedeutung zu [35, 38].

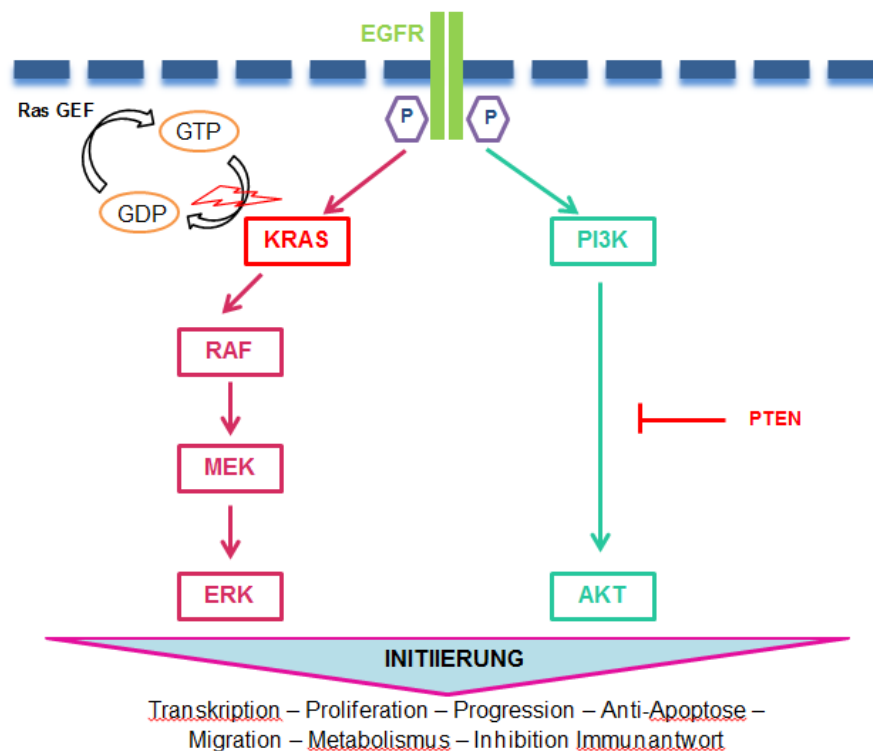


Abb. 4: Überblick über Signaltransduktionswege unter Beteiligung von KRAS

Modifiziert nach:

Ciardiello, F., et al., (2008). EGFR antagonists in cancer treatment. *New England Journal of Medicine* [39].

Lievre, A., et al., (2017). Protein biomarkers predictive for response to anti-EGFR treatment in RAS wild-type metastatic colorectal carcinoma. *British Journal of Cancer* [40].

Vor diesem Hintergrund wird im Rahmen der Therapie eines fortgeschrittenen Pankreas-karzinoms die Möglichkeit einer Inhibition der Signaltransduktionswege genutzt. Hier macht man sich die Funktion von monoklonalen Antikörpern, wie zum Beispiel Erlotinib, zu Nutze. Hierbei handelt es sich um einen selektiven Inhibitor des EGF-Rezeptors (erbB/Her-Rezeptor), einer Tyrosinkinase. Die Substanz zeigt seine Wirkung, indem es die intra-zelluläre Transphosphorylierung des Rezeptors hemmt [31] und somit die Signalweiterleitung im Verlauf der EGF-abhängigen Transduktionswege unterbrochen wird [32].

3. Klinische Parameter und Biomarker – Prognostische und prädiktive Faktoren

Trotz des Fortschrittes, welcher sich im Hinblick auf die Behandlungsmöglichkeiten des fortgeschrittenen und metastasierten PCA verzeichnen lässt, bleibt die Prognose für die Mehrheit der betroffenen Patienten sehr schlecht. Demzufolge liegt der Schwerpunkt der Forschung auf möglichen prognostischen oder auch prädiktiven Faktoren, die im Sinne einer personalisierten Therapie helfen sollen, die richtige therapeutische Wahl zu treffen und eine Verbesserung des Gesamtüberlebens zu erzielen [8, 31, 34]. Hierzu werden potentielle Biomarker gesucht, welche die Tumorbilogie widerspiegeln können oder prognostische Aussagen ermöglichen. Darüber hinaus sollen prädiktive Biomarker eine Vorhersage über die Effektivität spezieller Therapieansätze ermöglichen, wie beispielsweise Kombinationsschemata mit Erlotinib oder Chemotherapie-Schemata mit FOLFIRINOX oder Gemcitabine/ nab-Paclitaxel-Kombinationen [31, 41].

Als prognostische Faktoren gelten bereits der Tumormarker Karbonhydrat-Antigen 19-9 (CA 19-9), das TNM-Stadium (► 1.3. Tumorstadien, -Klassifikation und Therapieoptionen), der klinisch-chemische Entzündungsparameter C-reaktives Protein (CRP) und der Karnofsky-Index (KPS) des Patienten [7, 32], welche im Rahmen der klinischen Diagnostik und der Behandlung des Pankreaskarzinoms etabliert sind.

Gerade der KPS konnte durch diverse klinische Studien [9, 34, 42] an Wichtigkeit gewinnen. Dabei zeigte sich, dass Patienten mit einem KPS von 90 – 100% von auf Gem basierenden Chemotherapie-Kombinationen oder einer alleinigen Gabe von Gem profitieren, während hingegen Patienten mit schlechtem Allgemeinzustand sich mittels einer anderen Therapieoption das Gesamtüberleben (OS, overall survival) und das Progressionsfreien Intervall (PFI, TTP, time to progress) verbessert und ein Behandlungserfolg erreicht werden kann [9, 42, 43].

CA19-9 stellt einen Tumormarker des Serums dar. Es stellt den sensitivsten und am meisten spezifischen Biomarker beim Pankreaskarzinom dar [44]. Hier können in nahezu 90 % der Fälle erhöhte Werte nachgewiesen werden [45]. Verschiedene Studien zeigten auf, dass der initiale CA19-9-Level im Serum vor Therapiebeginn mit dem Gesamtüberleben (OS, overall survival) der Patienten einerseits, sowie mit der Zeit bis zu Tumorprogression (TTP, time to progress), korreliert [21, 45, 46]. Als ein unabhängiger prognostischer Faktor, wird CA19-9 im klinischen Alltag adjuvant zur Diagnostik, dem Management und der Verlaufskontrolle der Tumorentwicklung herangezogen [44].

Im Gegensatz zu diesen klinischen und biochemischen Prognosefaktoren war es bisher jedoch nicht ausreichend möglich, molekulare Biomarker zu identifizieren, welche von prognostischer oder gegebenenfalls sogar prädiktiver Wichtigkeit für die Behandlung mit

monoklonalen Antikörpern wie Erlotinib wären [31, 32, 41]. Diverse Nachforschungen am Kolonkarzinom beispielsweise zeigten auf, dass die Behandlung mit monoklonalen Antikörpern, welche den EGF-Rezeptor hemmen dann wirkungsvoll ist, wenn ein Wild-Typ im KRAS-Gen vorliegt, während Mutationen in diesem Gen mit einer Resistenz gegen dieselbe Wirkstoffklasse verbunden sind [47, 48]. Der KRAS-Status in der Rolle als prädiktiver Marker ist hier bereits gesichert. Andere ebenfalls etablierte Biomarker in diesem Zusammenhang stellen Mutationen im EGFR-Gen, sowie eine Überexpression von EGFR-Genkopien dar [48].

Beim Pankreaskarzinom wiederum konnten bisher weder EGFR-Überexpressionen [49], noch Polymorphismen oder Amplifikationen im Gen einen Zusammenhang mit dem Erfolg einer Therapie mit Erlotinib aufzeigen [30, 32, 41]. Daher konzentrieren sich die Untersuchungen derzeit eher auf nachgeschaltete Komponenten der EGFR-Signalkaskaden (►Abb. 4). Neben dem hierbei zentral involvierten KRAS sind ebenso beteiligte Proteine die Serin/Threonin-spezifischen Proteinkinase (AKT) im Rahmen des *PI3K-AKT-PTEN-Signalwegs* und die extrazellulär Signal-regulierte Proteinkinase (ERK) der *RAS-RAF-MEK-ERK-Kaskade*. EGFR-abhängig erfolgt eine von der Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) abhängige Phosphorylierung der AKT (pAKT). Phosphoryliertes AKT stellt einen wichtigen Mediator der Proteinsynthese und des Überlebens von Zellen dar. Reguliert wird seine Aktivierung durch den Tumorsuppressor Phosphat und Tensin homolog (PTEN) [31]. Möglicherweise steht ein deregulierter *PI3K-AKT-PTEN-Signalweg* in einem Zusammenhang mit dem Gesamtüberleben von PCA-Patienten [50, 51]. Allerdings zeigten sich auch Studien mit kontroversen Ergebnissen [41]. Des Weiteren scheint bis zum jetzigen Zeitpunkt PTEN eher keinen Einfluss auf die Wirksamkeit einer Therapie mit Erlotinib zu haben [31, 32, 41]. Hinsichtlich der Bedeutung von ERK konnte eine negative Korrelation zwischen dem Expressionslevel und dem Gesamtüberleben der Patienten mit PCA gezeigt werden [31, 41].

Für die meisten humanen Krebsarten stellen Mutationen im Tumorsupressorgen p53 einen wichtigen Schritt in der Tumorgenese dar. So lassen sich im Allgemeinen und mit eingeschlossen beim PCA, in bis zu 80 % Mutationen oder Deletionen nachweisen [11, 31]. Vermutlich kann auch für Mutationen im p53-Gen und einer damit verbundenen Funktionslosigkeit des Proteins eine hinsichtlich des PFI prognostische, eventuell sogar auch für eine Therapie mit Erlotinib prädiktive Rolle zugesprochen werden. Ebenfalls zeigten sich Überexpressionen im Gen als negativer Faktor, was mutmaßen lässt, dass dadurch ein funktioneller Schaden verursacht wird [41]. Allerdings scheint ein negativer Einfluss auf das OS nicht vorzuliegen [11, 34, 41].

Unter die Marker der Tumobiologie und ebenfalls zu den Tumorsupressoren zählend, fällt Smad4 (DPC4), ein Protein, welches in die intrazellulären Prozesse des Wachstumsfaktors

TGF- β 1 eingebunden ist. Smad4, bzw. ein Fehlen des intakten Proteins, scheint unter anderem als negativer prognostischer Faktor hinsichtlich des OS beim PDCA eine Rolle zu spielen [11]. In einigen Studien kann Smad4 auch als Biomarker hinsichtlich der Frequenz auftretender Metastasierung beim Pankreaskarzinom gewertet werden [31].

Zu weiteren wichtigen Zielparametern derzeitiger Studien zählen auch molekulare Biomarker, welche prädiktiv für eine effektive Therapie mit Gem oder speziellen Therapieansätzen mit nab-Paclitaxel sind. Hierzu zählen hENT1 (der human equilibrative nucleoside transporter 1) und SPARC (das secret protein acidic and rich in cysteine) [1, 41, 52].

Den Biomarker mit der sicherlich größten Bedeutung jedoch stellt KRAS dar, das im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit auf seinen prognostischen Wert beim fortgeschrittenen Pankreaskarzinom bei Patienten unter palliativer Chemotherapie untersucht wurde.

4. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Punktmutationen im KRAS-Gen kommen beim fortgeschrittenen Pankreaskarzinom mit zwischen 70 und 90 % häufig vor. Bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt wurde die Rolle von KRAS als prognostischer oder prädiktiver Marker beim PDAC noch nicht klar definiert [29, 31, 52]. Einige internationale Studien zum PDAC untersuchten bereits die Korrelation des KRAS-Status mit dem Überleben der Patienten. Nahezu durchgehend zeichnete sich eine Assoziation von KRAS-Mutationen mit einer schlechteren Überlebenswahrscheinlichkeit ab [7, 8, 11, 30, 34]. KRAS würde demnach als ein rein negativ prognostischer Faktor für Patienten mit Pankreaskarzinomen gelten. Sehr häufig waren die untersuchten Patientengruppen unselektiert, eine einheitliche Trennung zwischen einer Chemotherapie mit oder ohne Zugabe von Erlotinib lag meist nicht vor. Aus diesem Grund war es bisher nicht möglich, zwischen der rein prognostischen Bedeutung des KRAS-Status und eines prädiktiven Wertes für Erlotinib zu unterscheiden [31]. Lediglich vereinzelt unterstützen kleinere Studien auch die Annahme eines prädiktiven Wertes von KRAS für eine Therapie mit dem Tyrosinkinase-Hemmer Erlotinib [29].

Im Rahmen der AIO-PK 0104-Studie, welche 2013 der hier vorliegenden Arbeit voranging, wurden KRAS-Analysen an einer Patientenpopulation von PDAC-Patienten vorgenommen (n = 173), welche durchweg eine chemotherapeutische Kombinationstherapie inklusive Erlotinib erhalten hatten. Die statistische Auswertung erbrachte hierbei ebenfalls einen Überlebensvorteil für Patienten mit Karzinomen, welche einen Wildtyp im KRAS-Gen aufwiesen [32].

Um schließlich im direkten Vergleich mit den Ergebnissen der AIO-PK 0104-Studie die eindeutige Relevanz des KRAS-Status feststellen zu können, folgten die Analysen der hier vorliegenden Arbeit. Es wurde gezielt eine Fallkohorte von Pankreaskarzinom-Patienten zusammengestellt, welche eine reine Erstlinienmedikation ohne Einbezug von Erlotinib erhalten haben. Hieran erfolgte die Detektion von KRAS-Punktmutationen im Tumorgewebe, welche die Genabschnitte Exon 2, 3 und 4 abdeckte. In der darauf folgenden statistischen Auswertung lag das Augenmerk auf den absoluten Häufigkeiten der aufgetretenen Punktmutationen und -Subtypen, auf dem Vergleich von Mutationsträgern und Wildtyp hinsichtlich des mittleren Überlebens sowie der genauen Untersuchung von Mutations-Subtypen und deren Einfluss auf das OS. Zusätzlich wurde eine Überprüfung von verschiedenen klinischen Parametern und deren Korrelation mit dem KRAS-Status vorgenommen.

Mittels der statistischen Auswertung von 160 Patientenfällen und in Zusammenschau mit den Ergebnissen der oben genannten, vorangegangenen Studie, sollte anschließend zwischen der rein prognostischen und prädiktiven Relevanz des KRAS- Mutationsstatus im Rahmen des fortgeschrittenen Pankreaskarzinoms unterschieden werden können.

Patientenmaterial und Methoden

1. Patientenkollektiv

1.1. Ein- und Ausschlusskriterien

Es galten folgende Einschlusskriterien für das Kollektiv als obligat: die histologisch gesicherte Diagnose eines fortgeschrittenen Adenokarzinoms des Pankreas und die medikamentöse Behandlung dieser Patienten in Form einer palliativen Erstlinien-Chemotherapie ohne zielgerichtete Substanzen, speziell ohne dem Tyrosinkinase-Hemmer Erlotinib.

Dabei war das Malignom des Pankreas entweder lokal fortgeschritten oder bereits metastasiert und zum Zeitpunkt des Therapiebeginns inoperabel. Zudem musste das entsprechende, für die Analysen notwendige Tumormaterial in Form von Paraffin-Blöcken vorhanden sein.

Ausschlusskriterien waren zum einen andere Tumorentitäten des Pankreas, wie zum Beispiel neuroendokrine Karzinome sowie zum anderen Patienten mit Zweitmalignomen. Außerdem wurden keine Patienten ausgewählt, welche eine neoadjuvante Behandlung des Pankreaskarzinoms in Form einer palliativen Chemotherapie oder einer Radiochemotherapie erhalten haben, wenn diese vor dem gewählten Beobachtungszeitraum dieser Studie lag.

1.2. Herkunft des Kollektivs

Das Kollektiv setzt sich zusammen aus dem Datenmaterial und zugehörigen Pankreaskarzinomgeweben von insgesamt 198 Patienten. Von diesen konnten letztendlich 160 Fälle erfolgreich analysiert und in die statistische Auswertung aufgenommen werden. Die Gründe für das Scheitern aus dem Kollektiv waren unzureichendes Tumormaterial für die angestrebten Analysen und eine geplante, jedoch nicht erfolgte Chemotherapie.

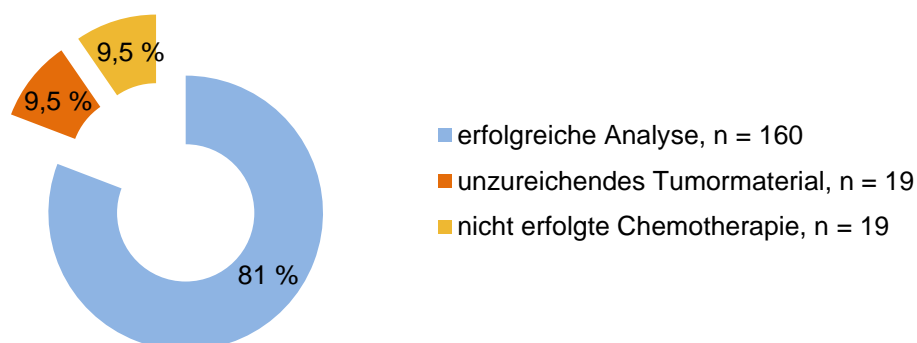


Abb. 5: Gesamtkollektiv und Anteil endgültiges Kollektiv

Drei große randomisierte Multicenter Phase II/III Studien lieferten den Hauptanteil der untersuchten Patientendaten und -Materialien. Die übrigen ausgewählten Patienten entstammten aus im Klinikum Großhadern (LMU) geführten Tumorregistern wie beispielsweise der ‚informative Patient‘. Für die hier vorliegende Studie waren im Vergleich zu den relativ großen Kollektiven der herangezogenen Studien jeweils nur wenige Patienten geeignet. Der Grund dafür war vor allen Dingen fehlendes oder auch fehlerhaftes Tumormaterial. Dabei wurde im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit an den entsprechenden Zentren retrospektiv Paraffinmaterial angefordert und zusammengestellt, welches den Patientendaten der herangezogenen und teilweise bereits mehrere Jahre abgeschlossenen Studien zugeordnet war.

Die Verwendung der Patientendaten innerhalb einer klinisch-statistischen Analyse lag ein positives Ethikvotum vor (Projekt-Nummer 554-11 und 401-15). Alle Patienten wurden im Rahmen klinischer Studien oder für klinische Register, über die Verwendung anonymisierter Behandlungsdaten und Tumormaterial aufgeklärt oder waren zum Zeitpunkt der Dokumentation bereits verstorben.

Genaue Informationen zu den herangezogenen Studien und Herkunft des Kollektivs können in der folgenden Tabelle entnommen werden (► Tab. 1).

Studie Herausgeber/ Erscheinungsjahr	Fallzahl Studie (n)	In vorliegender Studie aufgenommener Anteil
Randomized phase III trial of gemcitabine plus cisplatin compared with gemcitabine alone in advanced pancreatic cancer [9] Heinemann/ 2006	195	59
Capecitabine plus oxaliplatin (CapOx) versus capecitabine plus gemcitabine (CapGem) versus gemcitabine plus oxaliplatin (mGemOx): final results of a multicenter randomized phase II trial in advanced pancreatic cancer [53] Böck/ 2008	190	45
EGFR pathway biomarkers in erlotinib-treated patients with advanced pancreatic cancer: translational results from the randomised, crossover phase 3 trial AIO-PK0104 [32] Böck & Heinemann/ 2013	173	18
Tumorregister Großhadern	-	38

160

Tab. 1: Herkunft der Patientendaten und Untersuchungsmaterialien

2. Untersuchungsmaterial

Das Untersuchungsmaterial lag in Form von in Paraffin eingebetteten Gewebeproben vor. Es handelte sich dabei in erster Linie um Stanzbiopsien oder Gewebsexzidaten oder -resektaten aus dem Primärtumor oder aber aus Metastasen des vorliegenden Pankreaskarzinoms.

2.1. Herstellung von Paraffinblöcken

2.1.1. Fixierung

Zur Herstellung von Paraffinblöcken wird das Frischgewebe fixiert. Durch die Fixierung bleibt das Gewebe so weit wie möglich in seinem vitalen Zustand erhalten, indem die Autolyse der Zellen verhindert wird. Diese wird durch zelleigene Enzyme hervorgerufen. Zusätzlich erfolgt durch den Vorgang der Fixierung eine Härtung des Materials, wodurch die Schneidfähigkeit am Mikrotom verbessert wird. Des Weiteren werden im Untersuchungsgut vorhandene Bakterien und andere Mikroorganismen durch die Fixierung vernichtet. Als Fixativum dient häufig Formalin, welches die Eiweißmoleküle im Gewebe denaturiert und vernetzt. Die natürliche Struktur der vitalen Zelle verändert sich dadurch zu einem histologischen Äquivalenzbild zum Ursprungsgewebe [54].

2.1.2. Einbettung

Im Anschluss an die Fixierung folgt die Einbettung der Gewebeprobe in Paraffin. Durch die entstandenen Paraffinblöcke wird die Weiterverarbeitung des Gewebes ermöglicht.

Das Paraffin liegt bei der Blockherstellung bei einer Temperatur von 50 – 70° Celsius in flüssiger Form vor. Das Gewebematerial wird, in kleinen, Plastik- oder Metallbehältnissen liegend, mit dem wachsähnlichen Paraffin übergossen. Nach dem Erkalten und damit Erstarren des Paraffins, entsteht der Block, welcher im Inneren die Gewebeprobe enthält. Das zu untersuchende Gewebe kann nun am Mikrotom in wenige Mikrometer dünne Scheiben geschnitten werden, welche dann, auf Objektträger aufgezogen, anschließend für weitere Schritte der Diagnostik oder der Forschung wie Übersichts- und Spezialfärbungen, immunhistochemische Anwendungen oder DNA-Extraktion verwendet werden.

2.2. Bearbeitung der Paraffinblöcke am Mikrotom

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Rotationsmikrotom verwendet. Von jedem Paraffinblock wurden je zehn Schnitte angefertigt und auf Glasobjektträger aufgezogen.

2.2.1. Arbeitsweise am Mikrotom

Der Paraffinblock wird in eine Vorrichtung eingespannt, wodurch er eine Ausrichtung in der Frontalebene erhält. Es ist möglich die genaue Lage des Blocks mittels Schrauben in jeder Ebene zu justieren, so dass dieser möglichst parallel zur Oberfläche angeschnitten werden kann. Die Metallklinge wird ebenfalls in Frontalebene unterhalb und nach vorne (in Richtung des Bearbeiters) versetzt in einen Klingenhalter eingelegt und fest gezogen.

Es besteht die Möglichkeit zwischen verschiedenen Klingen je nach Gewebeart zu wählen. Vorrangig hatte hier A35, ein Klingentyp, der auch für hartes Gewebe und extra dünne Schnitte geeignet ist, sowie S35, ein Universalmesser, Verwendung gefunden.

Mittels Rotationskurbel wird der eingespannte Block vom Arbeitenden an dem Messer in vertikaler Richtung vorbeigeführt, wodurch hauchdünne Schnitte entstehen.

Die Dicke der Schnitte wird am Mikrotom eingestellt, hängt aber auch ab von der Block- und Raumtemperatur sowie von der Übung der schneidenden Person.

Für die vorliegenden Forschungsarbeiten war es nötig, Schnitte in einer Stärke von maximal zwei Mikrometer (= Dünnschnitte) anzufertigen. Dadurch stehen sie auch nachfolgenden immunhistochemischen Analysen zur Verfügung.

Die Blöcke sollten vor dem Schneiden auf einer Kühlplatte separat auf -15 bis -20° Celsius gebracht werden. Dies vereinfacht die Schnittherstellung dadurch, dass sich der Gewebeblock bei Raumtemperatur während der Schnittherstellung nicht allzu schnell ausdehnen kann und somit die entstehenden Schnitte eine möglichst gleichmäßige Dicke erreichen. Verstärkt werden kann dieser Vorteil, wenn die Blöcke bei Gefriertemperatur gelagert werden.

Der erhaltene Schnitt wird mittels dünnen Haarpinseln und geschickter Fingertechnik vom Messer in eine Wasserbadreihe übertragen. Zuerst wird ein Bad mit Leitungswasser einer Temperatur von ca. 15° Celsius verwendet, anschließend folgt ein Wasserbad von ca. 45° Celsius. Im Wasser entfalten sich die Schnitte und können dann auf den Objektträger aufgezogen werden.

Nutzen der abgestuften Temperaturerhöhung:

- Im ersten Bad können die Schnitte bis zum Aufziehen kurz verweilen, ohne dass die Proteine im Gewebe Schaden nehmen. Der Arbeitende kann die erarbeitenden Schnitte wenige Minuten sammeln.
- Durch die langsame Erwärmung der Schnitte wird das Gewebe geschont und dehnt sich nicht akut zu schnell aus, was zu Zellzerstörung und damit artifiziell verursachten Gewebeveränderungen führen kann.
- Eine abrupte Erwärmung, bzw. zu hohe Temperatur des Wasserbades, hat eine Denaturierung der Proteine zur Folge.
- Im Zweiten Bad sollten die Schnitte nur kurz schwimmen (Denaturierung!) und direkt aufgezogen werden. Das Gewebe entfaltet sich hier bei höherer Temperatur vollständig.

2.2.2. Weitere Behandlung der Schnittpräparate

Hat sich der Gewebeschnitt vollständig ausgebreitet, so wird er nun faltenfrei auf die Glasobjektträger aufgezogen. Es wurden Superfrost Plus Objektträger, welche eine besondere Beschichtung aufweisen, die eine stärkere Adhäsion von Gewebe und Objektträger bewirkt. Dadurch wird ein besseres Anhaften der Schnitte am Glas gewährleistet. Um die vollständige Fixation des Gewebes am Objektträger zu erreichen, werden die Gewebeschnitte für 10 bis 20 Stunden in einem Trockenschrank bei einer Temperatur von ca. 50° Celsius gelagert. Überschüssige Flüssigkeit trocknet ein und kleinste Fältchen werden dadurch aus dem Gewebeschnitt entfernt.

2.2.3. Darstellung möglicher Komplikationen

Ein Nachteil bestand darin, dass die Paraffinblöcke bereits im Rahmen diagnostischer Untersuchungen verwendet wurden, so dass entsprechend teilweise nur sehr wenig Material für die DNA-Extraktion zur Verfügung stand. Es verlangte ein gewisses Maß an Sorgfalt und Geschicklichkeit, ausreichend viele Schnittpräparate zu gewinnen.

Außerdem bestehen allgemeine mögliche Komplikationen und Schwierigkeiten, welche im bei der Anfertigung von Gewebeschnitten auftreten können. Zum einen führen kleine sehr harte oder kalkige Areale im Gewebe dazu, dass Scharten entstehen, die zum Zerreißen eines Schnittes oder einer Schnittserie führen. Auch Bereiche im Gewebe, die im Zuge der Einbettung ungenügend mit Paraffin getränkt wurden oder schon vorher ungenügend fixiert sind, können zu derartigen Phänomen führen.

2.2.4. Übersicht über Materialien und Geräte

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die zur Schnittherstellung verwendeten Materialien und Geräte (► Tab. 2).

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller, Vertrieb</u>
Verbrauchsmaterialien	
Objektträger Menzel-Gläser Superfrost	Thermo Scientific, Gerhard Menzel B.V. & Co.KG, Braunschweig, Deutschland
Mikrotomklingen S35 und A35	pfm medical ag, Köln, Deutschland
Geräte- und Laborausstattung	
Rotationsmikrotom Leica	Modell RM 2255, Leica Mikrosystems Nussbach GmbH, Nussbach, Deutschland
Kühlplatte	Medite TKF 22, Quick Cool Unit, Deutschland
Wärmebecken	Typ 24900, Medax GmbH&Co.KG, Rendsburg, Deutschland
Trockenschrank	Typ UM500, Memmert GmbH&Co, Schwabach, Deutschland

Tab. 2: Übersicht über Verbrauchsmaterialien und Geräte für die Schnittherstellung

3. DNA-Extraktion

3.1. Zieldarstellung der angewandten Methode

Die DNA-Extraktion stellt die Grundlage für die KRAS-Analyse dar.

Ziel dieses Arbeitsschrittes ist es, die zu untersuchende DNA in ausreichender Menge zu gewinnen und diese in eine Form der dauerhaften Aufbewahrung zu bringen. Dadurch können die weiteren Analyseschritte flexibel angeschlossen werden.

Die Extraktion erfolgt in zwei Phasen:

- Materialgewinn und Proteolyse/ Inkubation
- DNA-Isolierung mittels QIAcube (Analyseautomat)

Durch die DNA-Extraktion wird die gesuchte Nukleinsäure aus den Zellen des vorliegenden Tumorgewebes isoliert und aufgereinigt. Zellbestandteile und -Proteine, welche sich bei der anschließend durchzuführenden Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und der Pyrosequenzierung als Störfaktoren zeigen und ein Sequenzanalysenergebnis verfälschen würden, werden durch diesen Isolierungsvorgang entfernt.

3.2. Übersicht über Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Geräte

Für die hier vorliegende Arbeit durchgeführten Analysen wurde das QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50), der Firma QIAgen verwendet. Im Kit enthalten sind ein ATL-Puffer und die Proteinase K, welche zur Proteolyse notwendig sind. Zwei Wasch-Puffer (AW1 und AW2), ein AL-Puffer sowie ATE-Puffer finden bei der sich an die Proteolyse anschließende DNA-Isolierung am Analyseautomaten QIAcube Anwendung.

Die folgende Tabelle zeigt eine Übersicht über die verwendeten Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Geräte (► Tab. 3).

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller, Vertrieb</u>
Reagenzien	
Xylol: Isomere > 98 % rein	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Ethanol ≥ 99,5 %, Ph.Eur. reinst	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50) Proteinase K, ATL-, AL sowie AW1/2-Buffer, tubes (1,5 ml), columns;	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Verbrauchsmaterialien	
neoLab – Skalpellklingen steril Fig. 16	neoLab Migge Laborbedarf-Vertrieb GmbH, Heidelberg, Deutschland
SafeSeal Reagiergefäß 2 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Filter-tips 1000 µl	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Rotor-Adapter	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Geräte- und Laborausstattung	
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc., Bohemia, USA
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
QIAcube	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

Tab. 3: Übersicht über Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Geräte bei der DNA-Extraktion

3.3. Vorbereitung des Untersuchungsmaterials

3.3.1. Diagnostizierung des Tumorareals

Da die meisten Gewebe als Schnittpräparat auf dem Objektträger aufgezogen relativ farblos erscheinen, wird ein Schnitt pro Paraffinblock in Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Es handelt sich hierbei um eine Übersichtsfärbung, eine Kombinationsfärbung aus einem basischen (Hämatoxylin = blau) und einem sauren (Eosin = rot) Farbstoff. Die Farbmoleküle gehen mit unterschiedlichen Gewebekomponenten, auf der jeweiligen Ladung basierend, Ionenbindungen ein und färben diese spezifisch an. So können die Gewebezellen unter dem Lichtmikroskop beurteilt werden und normal differenziertes Gewebe von Tumorarealen unterschieden werden. Die Diagnostizierung und genaue Markierung des vom Tumor befallenen Bereiches im Schnittpräparat bildete die Grundlage für die anschließende DNA-Extraktion.

Die folgende histologische Abbildung zeigt exemplarisch einen Ausschnitt eines ausgewählten Tumorareals im Leberbiopsat (► Abb. 6).

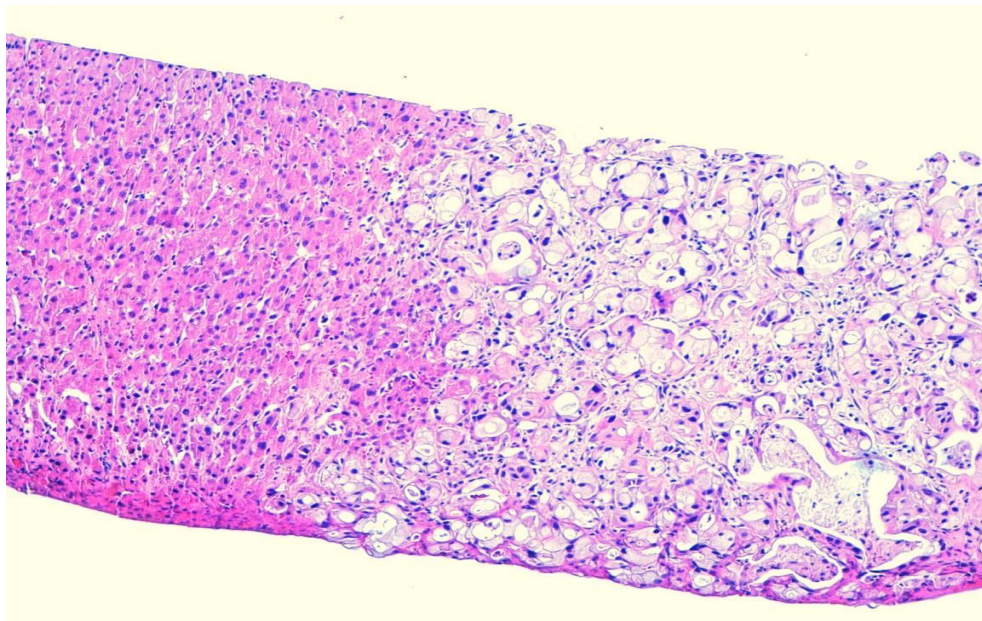


Abb. 6: Tumorareal im Leberbiopsat exemplarisch

HE-Färbung, 10-fach Vergrößerung;

Rechte Bildhälfte: Tumorinfiltrate eines PDAC, linke Bildhälfte: normales Leberparenchym;

3.3.2. Entparaffinierung der Schnittpräparate

Zunächst müssen die Schnittpräparate vom Paraffin befreit werden. Als ersten Schritt der Entparaffinierung werden die Objektträger dazu für 2 x 10 Minuten in Xylol eingestellt. Xylol ist ein aromatischer Kohlenwasserstoff, welcher hier als Lösungsmittel für Paraffin Verwendung findet. Xylol selbst ist nur schlecht in Wasser löslich, jedoch gut in Ethanol.

Anschließend werden die Schnitte für weitere 2 x 10 Minuten in 100 % Ethanol belassen. Nachdem die Präparate im Anschluss ca. 20 Minuten luftgetrocknet sind, liegen die Gewebeschnitte in ihrer absoluten, entparaffinierten Form auf dem Objektträger vor.

3.4. Materialgewinn und Proteolyse

3.4.1. DNA-Gewinnung

Mittels Skalpell wurde der markierte Tumorbereich vom Objektträger möglichst exakt und gründlich abgehoben. Die folgenden Abbildungen veranschaulichen diesen Arbeitsvorgang im Sinne eines Vorher-Nachher-Vergleichs (► Abb. 6a + b).

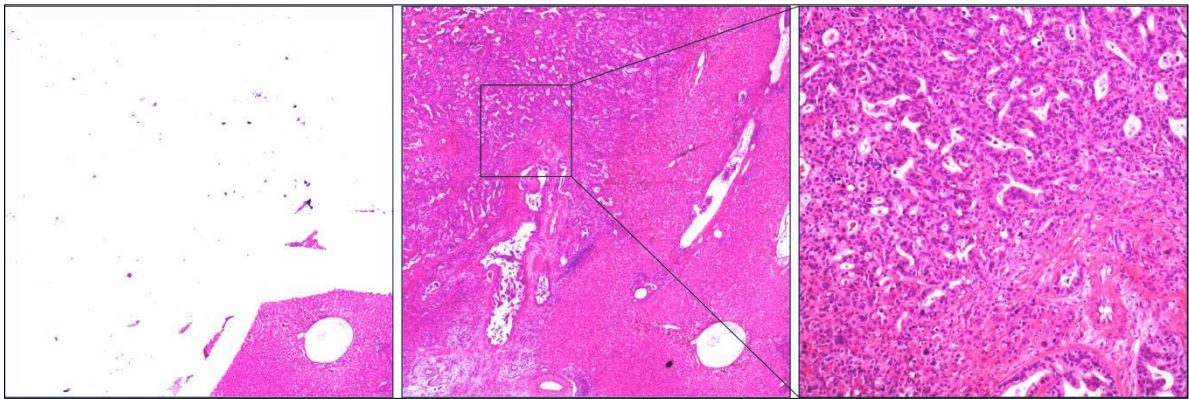


Abb. 7a: Vorher-Nachher-Vergleich: Tumorareal mit angrenzendem Normalgewebe

HE-Färbung, 10-fach Vergrößerung;

Bilderfolge a: Resektat Lebermetastase: Z. n. Entfernung des Tumorareals vom Schnittträger – Übersicht mit angrenzendem Normalgewebe der Leber am rechten und unteren Bildbereich – vergrößertes Tumorareal;

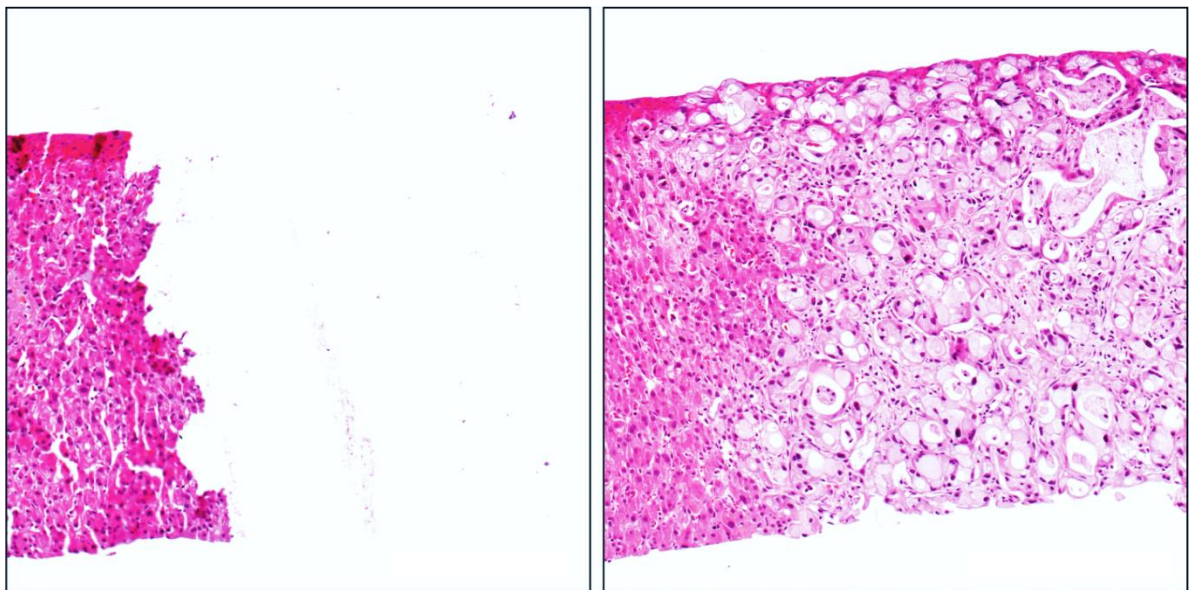


Abb. 7b: Vorher-Nachher-Vergleich: Tumorareal mit angrenzendem Normalgewebe

HE-Färbung; 10-fach-Vergrößerung;

Bildvergleich b: Stanze Lebermetastase: Z. n. Entfernung des Tumorareals vom Schnittträger – Tumorareal mit linksseitig angrenzendem Normalgewebe der Leber;

Das gewonnene Material wird in ein 2 ml fassendes und verschließbares Gefäß (SafeSeal Reagiergefäß) überführt. Die Reagiergefäße beinhalten 180 µl ALT-Puffer zum optimalen Lösen des Materials sowie 20 µl Proteinase K, ein proteolytisches Enzym.

Nach Materialgewinnung erfolgt ein sorgfältiges Mischen des Inhaltes in den Reagiergefäßen im Vortexmischer.

3.4.2. Proteolyse

Die Reagiergefäße werden anschließend für mindestens fünf Stunden oder über Nacht bei 65° Celsius und mit 450 rpm in einem Thermomixer inkubiert.

Während der Inkubation wird die zelluläre Struktur des Gewebes durch die Proteolyse aufgeschlossen und die DNA freigelegt. Daran ist maßgeblich das Enzym Proteinase K beteiligt. Die Proteinase K ist eine Serinprotease vom Subtilisin-Typ, welche sich aus dem saprophytischen Pilz *Tritirachium album* extrahieren lässt. Sie stellt hinsichtlich Temperaturerhöhung und pH-Wert-Veränderungen ein ziemlich stabiles Enzym dar, welches konstant eine hohe Aktivität aufweist und durch kurze Proteolysezeiten gekennzeichnet ist [55]. Bei Proteinasen handelt es sich um Proteine spaltende Enzyme. Es sind Endopeptidasen, d. h. sie spalten unspezifisch in Bereichen der Mitte eines Eiweißmoleküls. Serinproteasen tragen im aktiven Zentrum des Enzyms, die Aminosäure Serin [56].

Da 45 % der Zellmembran [54] und ein großer Anteil der zellulären Bestandteile aus Proteinen besteht, wird durch die Proteolyse während der Inkubation der Abbau störender Zellanteile und die Freilegung der Ziel-DNA erreicht.

3.5. DNA-Isolation am QIAcube

Bei dem Analysegerät QIAcube handelt es sich um ein vollautomatisches Gerät der Firma QIAgen. Der Automat führt die Extraktion von DNA oder auch RNA aus diversen Untersuchungsmedien wie zum Beispiel Blut, Urin oder Gewebszellen, durch. Der Vollautomat nutzt die für das Analyseprogramm speziellen Reagenzien und Materialien des QIAgen Kits (hier QIAamp DNA FFPE Tissue Kit), zudem eine im Gerät befindliche Mikrozentrifuge, welche mit geräteeigenen Reagieradaptoren (Rotor Adapter), Reagiergefäßen (Tubes, 1,5 ml) und Filtersäulen (Columns) bestückt wird sowie spezielle Pipettierspitzen (Filter-tips, 1000µl).

3.5.1. Ablauf und Prinzipdarstellung

Die DNA-Extraktion verläuft in sechs Schritten, wobei die ersten beiden –

- (1) Entparaffinierung und
- (2) Proteolyse durch Proteinase K

– handmethodisch abgearbeitet werden (► 3.3. Vorbereitung des Untersuchungsmaterials sowie 3.4. Materialgewinn und Proteolyse).

- (3) Automatisch folgt als ersten Schritt eine Inkubation bei 90° Celsius, bei welcher durch Formalin entstandene Vernetzungen gelöst werden.
- (4) Anschließend binden die DNA-Moleküle an der Membran, mit welcher die Filtersäulen (columns) in den Regagiergefäße ausgekleidet sind. Abfallzellprodukte und störende Proteine werden hier abgefiltert und somit die DNA von Restbestandteilen getrennt.
- (5) Durch die nachfolgenden Waschvorgänge wird die DNA vollständig aufgereinigt.
- (6) Zum Schluss wird die konzentrierte DNA mittels Zentrifugation von der Membran gelöst und liegt in 1,5 ml Reagiergefäßen in ATE-Puffer gelöst vor. Bei -20° Celsius ist eine Lagerung bis zur Sequenzierung für längere Zeit möglich.

aus: QIAamp DNA FFPE Tissue Handbook, 1/2009 [57]

3.5.2. Beladung des QIAcube

Um die DNA – Isolation am QIAcube starten zu können, muss das Gerät vorerst mit den folgenden Materialien beladen werden [58]:

- 1000µl Spitzen (Filter-tips) **(3)**
- Reagenzienhalter mit AW1 und AW2, AL und ATE-Puffer aus dem QIAamp Kit sowie 100 % Ethanol **(4)**
- QIAcube Rotor Adapter mit Filtersäulen (columns) und 1,5 ml Reagiergefäßen **(1)**
- 2 ml Reagiergefäße mit Inhalt: DNA, ATL-Puffer und Proteinase K **(2)**;

Die Abbildung auf der folgenden Seite zeigt den beladenen Innenraum des QIAcube.



- (1) Rotor Adapters mit Columns und Reagiergefäßen in Mikrozentrifuge
- (2) Reagiergefäße mit DNA, ATL-Puffer und Proteinase K
- (3) Filter-tips
- (4) Reagenzienhalter

Abb. 8: Beladung und Innenraum QIAcube
 modifiziert aus: QIAGEN, QIAcube user manual [58]

4. Grundlagen zur DNA

Um die weiteren hier angewandten Methoden ausreichend nachvollziehen zu können, werden im Folgenden Kapitel allgemeine und auch biochemische Grundlagen zur DNA kurz erläuternd zusammengefasst.

4.1. Aufbau und Bestandteile

Die gesamte genetische Information ist in Form der Desoxyribonukleinsäure (DNA) in sämtlichen Körperzellen auf den Chromosomen gespeichert. Dabei setzt sich die DNA-Doppelhelix aus zwei gegenüberliegenden und zueinander komplementären Strängen zusammen, welche ihrerseits aus einer definierten Nukleotid - Abfolge zusammengebaut sind.

Nukleotide sind chemische Moleküle, bestehend aus einer Base, einer Ribose (= Zucker-ring aus fünf Kohlenstoffatomen) und einem bis drei Phosphatresten. Als Basen stehen dem menschlichen Organismus zum Aufbau seiner DNA die Purinbasen Adenin und Guanin, sowie die Pyrimidinbasen Cytosin und Thymin zur Verfügung. Die Basen lagern sich stets dem komplementären Basenpartner gegenüber und werden durch Wasserstoffbrückenbindungen verbunden. Guanin und Cytosin sowie Adenin und Thymin sind jeweils zueinander komplementär [37].

4.2. Chemische Bindungsreaktionen

Während vielerlei Reaktionsabläufen auf genetischer Ebene, unterläuft die DNA verschiedene enzymatische Vorgänge, bei welchen bestimmte chemische Bindungstypen im Molekül eine zentrale Rolle spielen. Da diese auch im Hinblick auf die im Folgenden erläuterte Polymerasekettenreaktion (PCR) sowie die Pyrosequenzierung eine entscheidende Rolle spielen, so wird hier auf die wichtigsten chemischen Bindungsreaktionen kurz eingegangen.

Ein Desoxynukleotidtriphosphat-Molekül (dNTP) besitzt jeweils ein 3'-Hydroxy-Ende (3'-OH-Ende) am dritten Kohlenstoffatom (C-Atom) der Ribose sowie ein 5'-Phosphat-Ende am fünften C-Atom der selbigen Ribose. Bei der Aneinanderknüpfung von Nukleotiden, findet zwischen diesen beiden Molekülanteilen die chemische Bindungsreaktion statt. Durch einen nukleophilen Angriff der OH-Gruppe des einen Nukleotids am Phosphat-Rest des anzuhängenden Nukleotids, kommt es durch Abspaltung von Pyrophosphat (PPi) zur Verbindung der beiden Nukleotide. Es ist eine energiearme Esterbindung entstanden.

Das energiereiche PPi liefert die nötige Energie zu dieser chemischen Bindung und wird seinerseits durch enzymatische Hydrolyse aus dem thermodynamischen Gleichgewicht entfernt. Zusätzlich bilden sich Wasserstoffbrücken zwischen den zueinander komplementären Basen aus und stabilisieren somit zusätzlich den Nukleinsäurestrang [37].

4.3. Funktion der DNA-Polymerase

DNA-Polymerasen sind Enzyme, welche eine entscheidende Rolle in der Synthesephase des Zellzyklus spielen. Während der Replikation erkennen diese Enzyme die spezifische Basenabfolge der zum Teil entwunden vorliegenden DNA-Einzelstränge – der Replikationsgabel – und synthetisieren mittels dazu komplementären Nukleotiden den neuen und somit DNA verdoppelnden DNA-Strang (► 4.2. Chemische Bindungsreaktionen).

5. Polymerasekettenreaktion (PCR)

5.1. Allgemeines Funktionsprinzip und Zielsetzung

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) können innerhalb weniger Stunden durch eine in vitro durchgeführte DNA-Replikation, Gen- bzw. DNA-Fragmente spezifisch vervielfacht (= amplifiziert) werden. Die Replikation erfolgt mittels einer thermostabilen DNA-Polymerase (Taq-Polymerase), ein Enzym, das aus thermophilen Bakterien (z.B. *Thermus aqua-*

ticus) isoliert wurde. Anhand dieser Methode lassen sich kleinste Mengen an DNA eindeutig nachweisen [37].

Die DNA, welche den zu amplifizierenden Genabschnitt enthält, liegt für die PCR in einem Reaktionsgemisch (Mastermix) gelöst vor. Der Mastermix besteht aus Nukleotiden und zwei speziell konstituierten Primern. Diese wiederum flankieren den gesuchten Genabschnitt auf der DNA und stellen als spezifische Bindungsstellen den Start- und Endpunkt für die Polymerase dar [37, 59].

Die PCR findet in Zyklen statt, wobei ein jeder in drei Schritten abläuft.

1. Denaturierung

Die DNA-Matrize wird durch Erhitzen auf 95° Celsius denaturiert und damit in zwei Einzelstränge gespalten. Dabei wird die Wasserstoffbrückenbindung zwischen den Basen aufgetrennt.

2. Annealing

Während dieses Schrittes lagern sich die beiden Primer an den auf dem Einzelstrang dazu komplementären Bereich an, der zu Amplifizierende Genabschnitt wird flankiert. Dieser Schritt findet bei einer Temperatur von 40 – 70° Celsius statt.

3. Amplifikation

Nun kommt es zur DNA-Synthese durch die thermostabile DNA-Polymerase. Das Enzym verlängert die Primer am freien 3'Hydroxy-Ende (3'OH-Ende) mit Hilfe von komplementären Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTP's) bei einer Temperatur von 70° Celsius.

Da jedes entstandene PCR-Produkt wieder als Matrize dient, erhöht sich die Zahl der synthetisierten Stränge bei jedem Zyklus exponentiell [37, 59].

5.2. PCR zur Darstellung des KRAS-Mutationsstatus: KRAS Exon 2, Exon 3 sowie Exon 4

5.2.1. Vorbereitungsarbeiten

Ein standardisiertes PCR-Protokoll beinhaltet auch Vorbereitungsarbeiten. Für die Erstellung des Mastermix sind neben dem Primer-Mix folgende Reagenzien nötig:

aufgereinigtes H₂O, Nukleotide und das HotStar Taq-Polymerase Kit mit einem 10 x Puffer und der Taq-Polymerase.

Gegebenenfalls muss der Primer-Mix neu angesetzt werden. Dieser beinhaltet folgende Primer je nach Exon, bzw. Codon:

KRAS Exon 2, Codon12/13

- Primer 1
(A1975 KRAS-Pyro-F1, 5'-nnn ggc ctg aaa atg act gaa-3', Biomers)
- Primer 2
(A1976 KRAS-Pyro-R1-BIO, 5'-tta gct gta tcg tca agg cac tct-3', Biomers)

KRAS Exon 3, Codon59/61

- Primer 1
(A2819 KRAS Ex3 p59, p61 F3, 5'-aat tga tgg aga aac ctg tct ctt-3', Biomers)
- Primer 2
(A2820 KRAS Ex3 p59, p61 R2-BIO, 5'-tcc tca act ggt ccc tca tt-3', Biomers)

KRAS Exon 4, Codon 117

- Primer 1
(A2780 KRAS Codon 117 F1, 5'-ctg aag atg tac cta tgg tcc tag-3', Biomers)
- Primer 2
(A2781 KRAS Codon 117 R1-BIO, 5'-ctg agc ctg ttt tgt gtc tac tg-3', Biomers)

KRAS Exon 4, Codon 146

- Primer 1
(A2789 KRAS Codon 146 F2, 5'-ggc tca gga ctt agc aag aag tta-3', Biomers)
- Primer 2
(A2790 KRAS Codon 146 R2-BIO, 5'-agt tat gat ttt gca gaa aac aga-3', Biomers)

Für die Analyse von Exon4 müssen je Codon eine einzelne PCR angesetzt werden.

Für den **Ansatz des Primer-Mix** gilt jeweils Folgendes:

- 60 µl Aqua
- 20 µl Primer1
- 20 µl Primer2

5.2.2. Pipettierungsschema Mastermix

Die folgende Tabelle zeigt das Pipettierungsschema des Mastermixes am Beispiel für 30 Ansätze:

	Stock	f.c.	1x	MM
H₂O			32,60	978,00
10 x Buffer	10 x	1,0 x	4,00	120,00
MgCl₂	25 mM	1,5 mM		0,00
dNTP	20 mM	0,2 mM	0,40	12,00
PrimerMix	20 µM	0,4 mM	0,80	24,00
TaqPol	5 U/µl	1,0 U	0,20	6,00
			40	
DNA			2,0	

Tab. 4: Pipettierungsschema Mastermix KRAS (Bsp. 30 Ansätze)

5.2.3. Amplifikation mittels Thermocycler

Der Ansatz von jeweils 40 µl MM + 2,0 µl DNA in Mikroreagiergefäßen (8er-Tubes) wird kurz gemischt, abzentrifugiert und anschließend in den Thermocycler eingesetzt. Das Programm (Hyp 50x60C-pyr) wird gestartet, welches ca. 2 bis 2,5 Stunden in Anspruch nimmt.

Hyp 50x60C-pyr		
1x	95 ° C	15 min
50x	95 ° C	30 sec
	60 ° C	30 sec
	72 ° C	30 sec
1x	72 ° C	2 min
	20 ° C	1 sec

Tab. 5: Schema Arbeitszyklus Hyp 50x60-pyr KRAS

5.2.4. Qualitätskontrolle

Um die Qualität des PCR-Ansatzes zu sichern werden bei jedem Ansatz zusätzlich Positiv- und Negativkontrollen analysiert.

Hinsichtlich der Negativkontrollen werden 40 µl MM und 2 µl reines Wasser sowie zusätzlich reiner Mastermix angesetzt, um die Reinheit des MM zu bestätigen.

Als Positivkontrollen wird DNA mit einem KRAS-Status ‚Wildtyp‘ verwendet, wodurch die Funktionalität des PCR-Laufes überprüft wird.

5.2.5. Übersicht über Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Geräte

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller, Vertrieb</u>
Reagenzien	
HotStarTaq DNA Polymerase Kit (50) 10xPuffer, TaqPolymerase, MgCl ₂ ;	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Aqua Bidest.	Braun
dNTP mix, 10mM each	Thermo Fisher Scientific Bioscience GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Primer:	
<ul style="list-style-type: none">• A1975 KRAS-Pyro-F1• A1976 KRAS-Pyro-R1-BIO• A2819 KRAS Ex3 p59, p61 F3• A2820 KRAS Ex3 p59, p61 R2-BIO• A2780 KRAS Codon 117 F1• A2781 KRAS Codon 117 R1-BIO• A2789 KRAS Codon 146 F2• A2790 KRAS Codon 146 R2-BIO	Biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland
Human Genomic DNA: Male, 100 µg	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Verbrauchsmaterialien	
Multiply-µStripPro, 8er Kette	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
SafeSeal Reagiergefäß 2 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
<u>Pipettenspitzen:</u>	
ClearLine Filter Tips 100 µl	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, Deutschland
SafeGuard Filterspitzen 1000 µl	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
SafeSeal Tips 20 µl/ 200 µl/1000 µl	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
OneTouch Barrier Tips 10 µl (1-20 µl)	Sorenson Bioscience Inc., Salt Lake City, USA

Geräte- und Laborausstattung

Hood: DNA/RNA UV-Cleaner UVC/T-M	Biosan Ltd., Riga, Lettland
Mikrozentrifuge iFuge M08VT	Neuation Technologies Pvt. Ltd., Gandhinagar, Indien
Mastercycler Pro	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
<u>Pipetten:</u>	
Pipetman classic 20 µl/ 200 µl/ 1000 µl	Gilson International B.V., Limburg an der Lahn, Deutschland
Reference 10 µl/ 100 µl/ 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Tab. 6: Übersicht über Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Geräte für die Polymerase-Ketten-Reaktion

6. DNA-Sequenzierung

6.1. Definition und Überblick

Unter DNA-Sequenzierung versteht man die Analysierung der genauen Nukleotidabfolge in einem DNA-Molekül.

Heute gibt es eine Vielzahl an etablierten Sequenzierungsmethoden. Eines der bekanntesten klassischen Analyseverfahren stellt die *Didesoxymethode nach Sanger* dar. Sie wird auch als Kettenabbruchsynthese bezeichnet. Die Methode basiert auf dem Einsatz von ddNTP's (Didesoxynukleotidtriphosphaten), welche mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Die Nukleotide besitzen keine 3'-Hydroxygruppe. Daher kann die DNA-Polymerase nur jeweils ein Nukleotid an den vorliegenden Primer anhängen und synthetisiert somit komplementäre DNA-Stränge unterschiedlicher Länge (► 4.2. Chemische Bindungsreaktionen sowie 4.3. Funktion der DNA-Polymerase) Mittels Laseranregung der Fluoreszenzfarbstoffe und anschließender Elektrophorese kann schließlich die genaue Nukleotidsequenz nachgewiesen werden [37]. Dies findet beispielsweise beim Big-Dye Terminator Sequencing Nutzen.

Des Weiteren existieren neuere moderne Verfahren zur Bestimmung der Nukleotidsequenz in der DNA. Hierzu zählt die in der hier vorliegenden Arbeit zur Darstellung des KRAS-Mutationsstatus angewandte Methode der Pyrosequenzierung nach Ogino.

Ogino und Mitarbeiter haben 2005 eine sensitive, robuste und gut reproduzierbare Methode entwickelt, durch welche KRAS-Mutationen mittels Pyrosequenzierung analysiert werden können [60]. In der Studie wurde Augenmerk auf den Vergleich zur Didesoxy-Methoden nach Sanger gelegt, wodurch ein Vorteil der Pyrosequenzierung gegenüber dieser demonstriert werden konnte. Die Mutationen wurden an Gewebeproben von Colon- und Pankreaskarzinom getestet. Diese Tumoren stellen heterogenes Gewebe dar, d.h. neben

den mutierten Tumorzellen, lassen sich auch einige Wildtyp-tragende Tumorzellen, Entzündungszellen, nicht neoplastische sowie mesenchymale Zellen in nächster Umgebung nachweisen, was eine eindeutige Identifizierung der Mutation mit herkömmlichen Sequenzierungsmethoden erschwert.

6.2. Pyrosequenzierung zur Darstellung des KRAS-Mutationsstatus: KRAS Exon 2, Exon 3 sowie Exon 4

Im Pathologischen Institut der Ludwigs-Maximilians-Universität wurde die Methode der Pyrosequenzierung bereits in einer Studie am Colorektalen Karzinom [61] auf Durchführung, Vergleichbarkeit mit der Big-Dye Terminator Sequenzierung und Replizierbarkeit geprüft. Hier wurde Augenmerk auf die Häufigkeit der verschiedenen KRAS-Mutationstypen beim CRC gelegt. Die Methode der Pyrosequenzierung wurde hierbei an Proben aus der Routine-Diagnostik angewandt.

Die hier vorliegende Arbeit stützt sich im Wesentlichen auf die Methode und die Durchführung der Pyrosequenzierung, wie sie in der oben genannten Studie beschrieben wurden.

6.2.1. Allgemeines Funktionsprinzip

Bei der Pyrosequenzierung handelt es sich um eine enzymatische, nicht elektrophoretische Methode zur DNA-Sequenzierung. Eine Reihe von Enzyme, an erster Stelle eine DNA-Polymerase, leisten hier ihren Beitrag zur Synthese des zur DNA-Sequenz komplementären Gegenstranges. Letztendlich wird eine korrekte Anknüpfung eines Nukleotids an das einzelsträngige und PCR-amplifizierte DNA-Template durch einen Lichtblitz sichtbar gemacht, welcher von einem Detektor erfasst und die Sequenzabfolge in eine Kurve (Pyrogramm) überführt. Diese kann anschließend vom Untersucher ausgewertet werden.

6.2.2. Vorbereitungsarbeiten

Bevor die Analyse am Pyrosequenzer gestartet werden kann, müssen diverse Reagenzien separat angesetzt werden.

Zum einen ist es notwendig die Lösung mit Streptavidin markierten Sepharose-Beads in die richtige Konzentration zu bringen und die für den Ansatz gewünschte Menge dieser

Verdünnung herzustellen. Dazu werden die Beads mit Binding Buffer und Aqua dest. der entsprechenden Menge angesetzt.

Für 30 Ansätze gilt:

Beads	30 µl
Binding Buffer	1200 µl
H ₂ O	720 µl
Gesamt	1950 µl

Tab. 7: Verdünnungsansatz Sepharose-Beads (Bsp. 30 Ansätze)

Nach einer Verdünnung mittels Annealing Buffer zu einer 3 µM Lösung wird ebenso der Primer, welcher vom Hersteller 100 µM konzentriert vorliegt, zum Erhalten der geforderten Ansatzmenge höher verdünnt.

Für 30 Ansätze gilt:

Primer (3 µM)	75,0 µl	Primer (3 µM)	
Annealing Buffer	675,0 µl	Annealing Buffer	97 µl
Gesamt	750 µl	100 µM Primer	3 µl

Tab. 8: Verdünnungsansatz Primer Pyrosequenzierung (Bsp. 30 Ansätze)

Außerdem ist es erforderlich mit Hilfe der *PyroMark™ Q24 Software* am Computer den Analyselauf zu erstellen und auf einem externen Speichermedium zu sichern. Hierbei wird die Anzahl der zu sequenzierenden Proben und Kontrollen angegeben sowie die genaue DNA-Sequenz, welche Exons und Codons analysiert werden sollen, um die entsprechenden Mutationen zu detektieren. Das Programm beinhaltet die genaue Nukleotidsequenz für den Normalfall eines Wildtyps. Außerdem werden die notwendigen Reagenzienmengenangaben, welche speziell für diesen Lauf berechnet werden, angegeben. Letztere können in der sogenannten *PreRun-Information* abgelesen werden.

Die folgende Abbildung zeigt beispielhaft einen Ausdruck einer *PreRun-Information* mit kurzen Erläuterungen.

Volume Information:

Reagents:

E-mix: 94 µl

S-mix: 94 µl

Nucleotides:

Nucleotide A: 59 µl

Nucleotide C: 57 µl

Nucleotide G: 62 µl

Nucleotide T: 57 µl

Cartidge schematisch

Die Buchstaben bezeichnen die vier Nukleotide sowie E für Enzym- und S für Substrat-Mix.

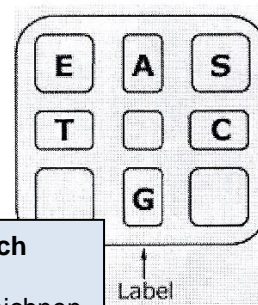


Plate setup:

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	KRAS Ex2 Ogino 64	KRAS Ex2 Ogino 66	KRAS Ex2 Ogino 67	KRAS Ex2 Ogino 68	KRAS Ex2 Ogino 69	KRAS Ex2 Ogino 70	KRAS Ex2 Ogino 71	KRAS Ex2 Ogino 72
B	KRAS Ex2 Ogino 73	KRAS Ex2 Ogino 74	KRAS Ex2 Ogino 75	KRAS Ex2 Ogino 77	+	-H2O	-	
C								

Plate setup:

- Analyse von maximal 12 Proben möglich
- Je nach angegebener Probenanzahl und Sequenzanalyse, erfolgt die automatische Bezeichnung des Programmnamens in die schematisierten Platefelder
- Manuelle Eingabe der Probennummerierung

Abb. 9: PreRun Information Ausdruck exemplarisch

6.2.3. Sequenzierung am Pyrosequenzer

Als ersten Schritt werden 15 µl des PCR-Produkts mit jeweils 65 µl der verdünnten Streptavidin-Beads in eine Platte pipettiert und für 10 Minuten auf einem Thermoschüttler inkubiert. Hierbei kommt es zu einer Koppelung zwischen dem biotinylierten Primer 2, welcher bei der PCR Verwendung fand, und dem Streptavidin der Beads. Dabei gehen die Proteine Biotin und Streptavidin eine kovalente Bindung ein.

Anschließend durchläuft die gebundene DNA eine Reihe an Lösungsbädern. Es erfolgen hier eine Denaturierung und ein Waschvorgang.

Im folgenden Schritt wird an den als Einzelstrang vorliegenden, mittels PCR amplifizierten DNA-Strang der Sequenzierungsprimer hybridisiert.

Im Rahmen der Pyrosequenzierung verwandte Primer:

- A1977 KRAS-Pyro S1 für Exon 2
- A2821 KRAS p59,p61 S5 für Exon 3
- A2782 KRAS Codon117 S1 und
- A2791 KRAS Codon146 S2 für Exon 4

Bis hierher erfolgt die Sequenzierung manuell durch den Untersucher. Die sich anschließenden Schritte erfolgen vollautomatisch durch den Pyrosequenzer.

Das Gerät wird mit einem Cartridge bestückt, einem Steckmodul mit Einspritzdüsen, welcher die Enzymmischung, das Substrat und die vier verschiedenen Nukleotide enthält. Die Reagenzien werden in den Cartridge hineinpipettiert.

Die Enzymmischung beinhaltet folgende Enzyme:

- DNA-Polymerase
- ATP-Sulfurylase
- Luciferase
- Apyrase

Das Substrat besteht aus Adenosin-5'-Phosphosulfat und Luciferin.

Im Pyrosequenzer werden der DNA nacheinander die verschiedenen dNTP's hinzugespritzt, welche die DNA-Polymerase zur Katalyse der Synthese des komplementären DNA-Stranges ausgehend vom 3'OH-Ende des Primers benötigt. Bei jeder dieser Verknüpfungsreaktionen kommt es – wie auch in Abschnitt ► 4.3. erläutert – zur Freisetzung von PPi.



Das Enzym ATP-Sulfurylase konvertiert PPi zu ATP unter Anwesenheit von Adenosin-5'-Phosphosulfat.



Das entstandene ATP treibt wiederum das Enzym Luciferase an, welche Luciferin in Oxyluciferin überführt. Durch diese Reaktion entsteht ein sichtbarer Lichtblitz, dessen

Stärke direkt proportional zur Menge der ATP-Produktion und somit auch zur Syntheseleistung der DNA-Polymerase ist. Die Lichtreaktion wird durch eine Detektor erfasst und zeigt sich als Peak im Pyrogramm.

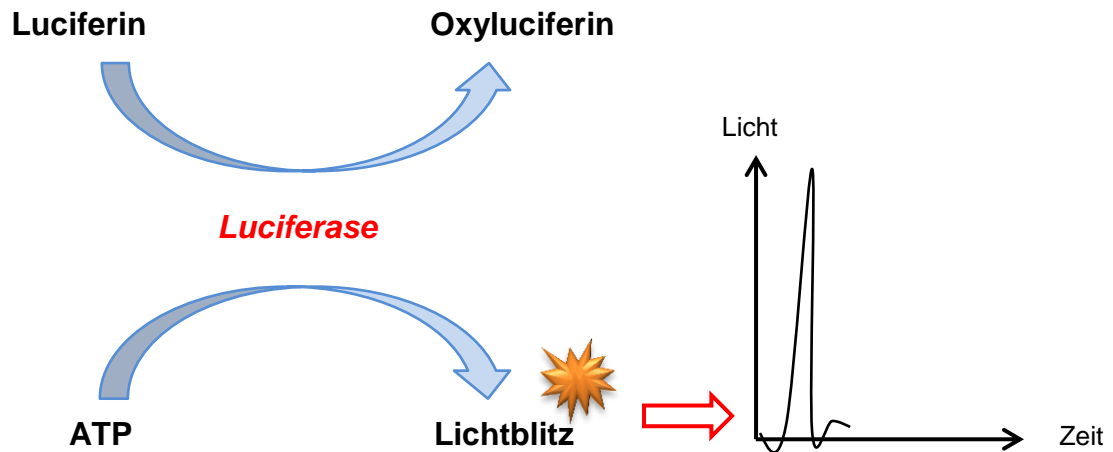


Abb. 10: Luciferase-Reaktion
modifiziert nach: QIAGEN, *PyroMark Q24 User Manual*. [57]

Das Enzym Apyrase baut die nicht angeknüpften Nukleotide und überschüssiges ATP kontinuierlich ab.



Prinzipdarstellung und Ablauf Pyrosequenzierung nach: [57] sowie [62].

6.2.4. Pyrogrammauswertung

Zur Auswertung werden die vom Sequenzierautomaten erstellten Pyrogramme mit der für den KRAS Wildtyp charakteristischen Kurven verglichen.

Die folgenden Abbildungen zeigen die spezifischen Pyrogramm-Kurven für den jeweiligen Wildtyp in den Exons 2, 3 und 4, die allgemeine Häufigkeit der vorkommenden Punktmutationen sowie deren charakteristische Verläufe im Pyrogramm.

6.2.4.1. Exon 2

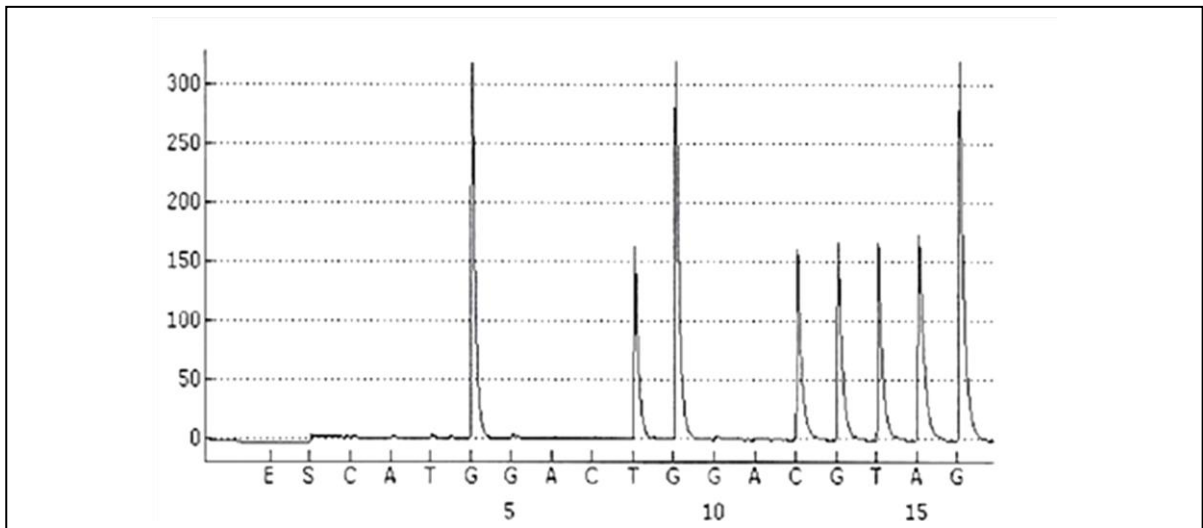


Abb. 11: KRAS, Exon 2 (p.12,13): Pyrogramm Wildtyp

Die spezifische Wildtyp-Sequenz im Exon 2 zeigt folgende Basenabfolge:

Wildtyp Exon 2: – GGTGGC –

Die folgende Abbildung veranschaulicht in einem schematischen Säulendiagramm die Häufigkeit des Auftretens der jeweiligen Punktmutationen im KRAS-Gen, Exon2, Codon 12 und 13. Im Allgemeinen haben die einzelnen Submutationen ein sehr unterschiedlich häufiges Vorkommen.

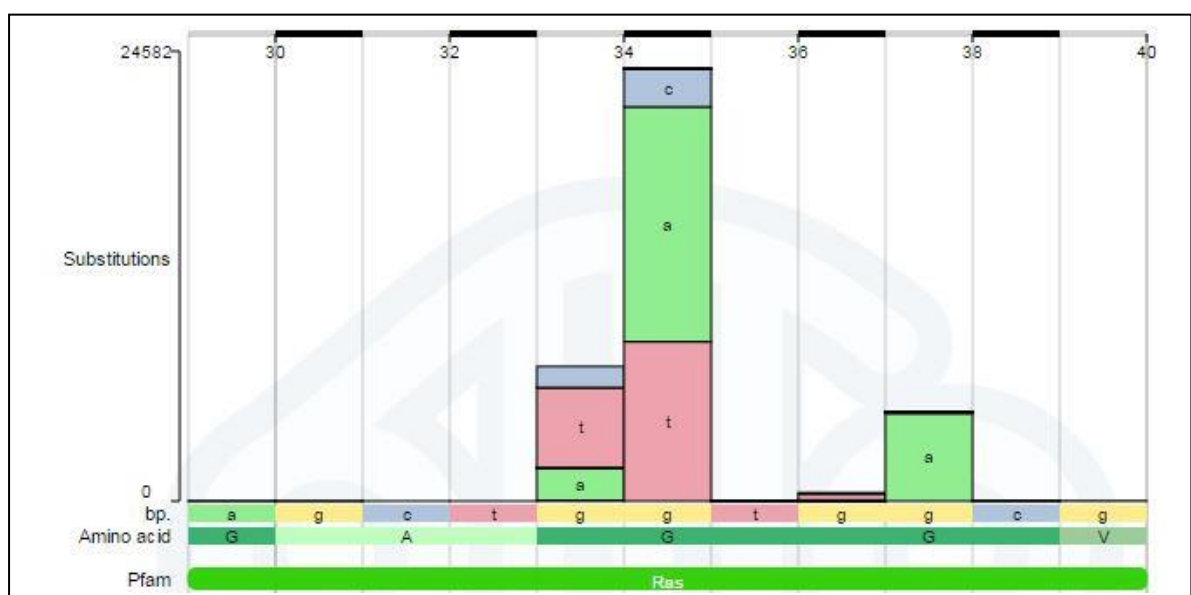


Abb. 12: Auftreten von Punktmutationen in KRAS Exon 2 (p.12,13)
aus: <http://cancer.sanger.ac.uk> (COSMIC) [81]

Hinsichtlich ihrer Häufigkeit treten die Punktmutationen in absteigender Reihenfolge (1-6) wie folgt auf.

c.35 G>A, p.G12D

c.35 G>T, p.G12V

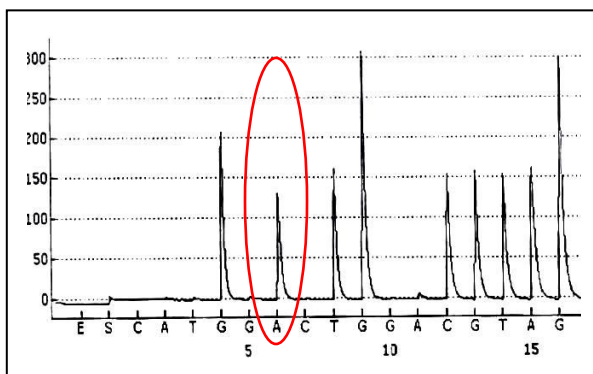
c.38 G>A, p.G13D

c.34 G>T, p.G12C

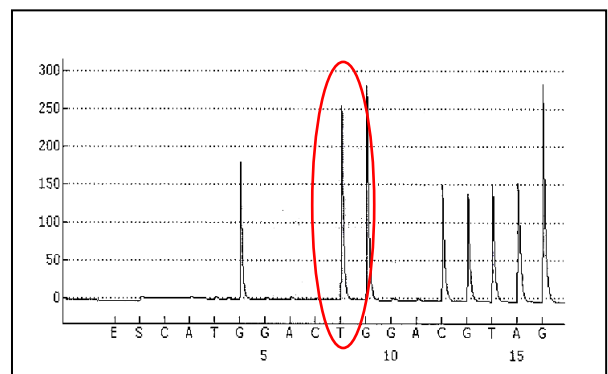
c.35 G>C, p.G12A

c.34 G>C, p.G12R

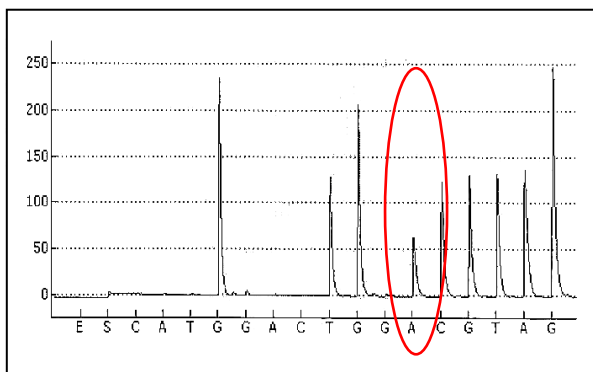
Die folgenden Abbildungen zeigen exemplarisch die entsprechenden Pyrogramme der häufigsten Punktmutationen im Exon 2. Bis auf die letzte Variante konnte in der vorliegenden Arbeit jede davon nachgewiesen werden.



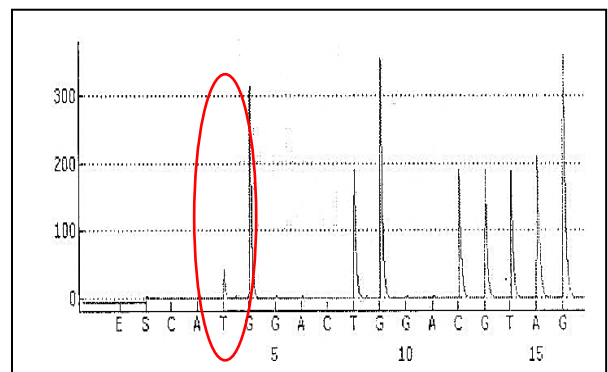
c.35 G>A, p.G12D



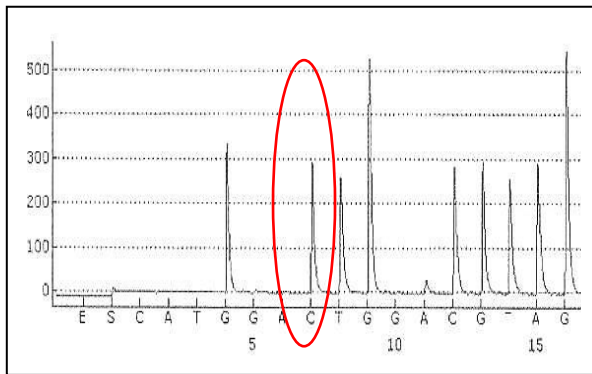
c.35 G>T, p.G12V



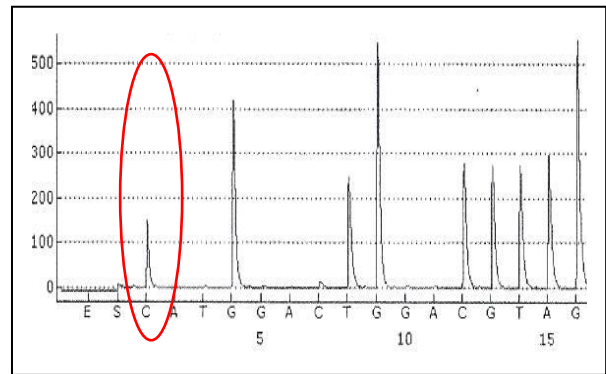
c.38 G>A, p.G13D



c.34 G>T, p.G12C



c.35 G>C, p.G12A



c.34 G>C, p.G12R

Abb. 13: Pyrogramme der gefundenen Punktmutationen in KRAS Exon 2 (p.12,13)

6.2.4.2. Exon 3

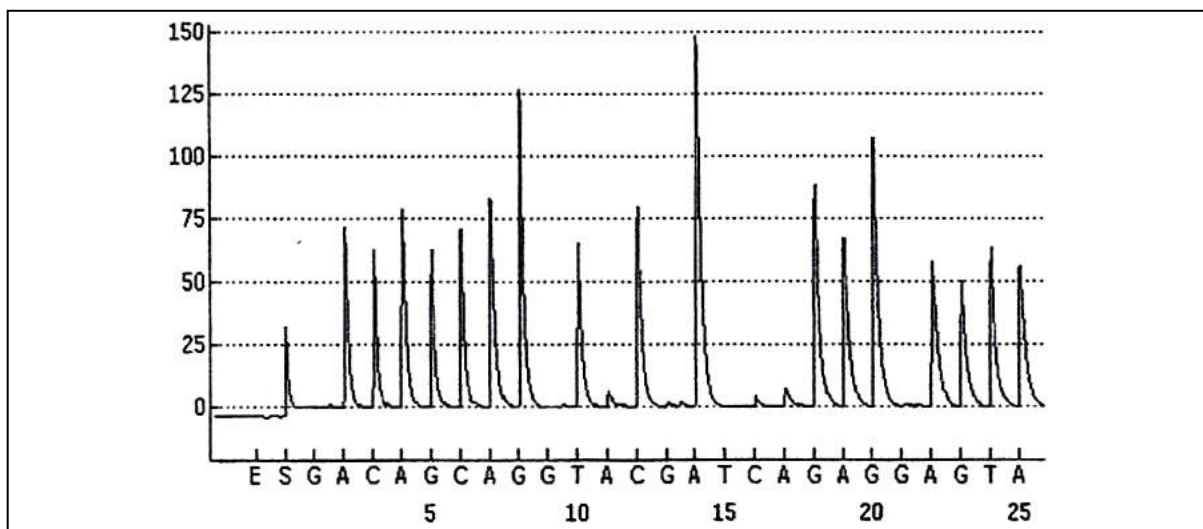


Abb. 14: KRAS, Exon 3 (p.59,61): Pyrogramm Wildtyp

Die spezifische Wildtyp-Sequenz im Exon 3 zeigt folgende Basenabfolge:

Wildtyp Exon 3: – GGTCAAG –

Die folgende Abbildung veranschaulicht in einem schematischen Säulendiagramm die Häufigkeit des Auftretens der jeweiligen Punktmutationen im KRAS-Gen, Exon 3, Codon 59 und 61.

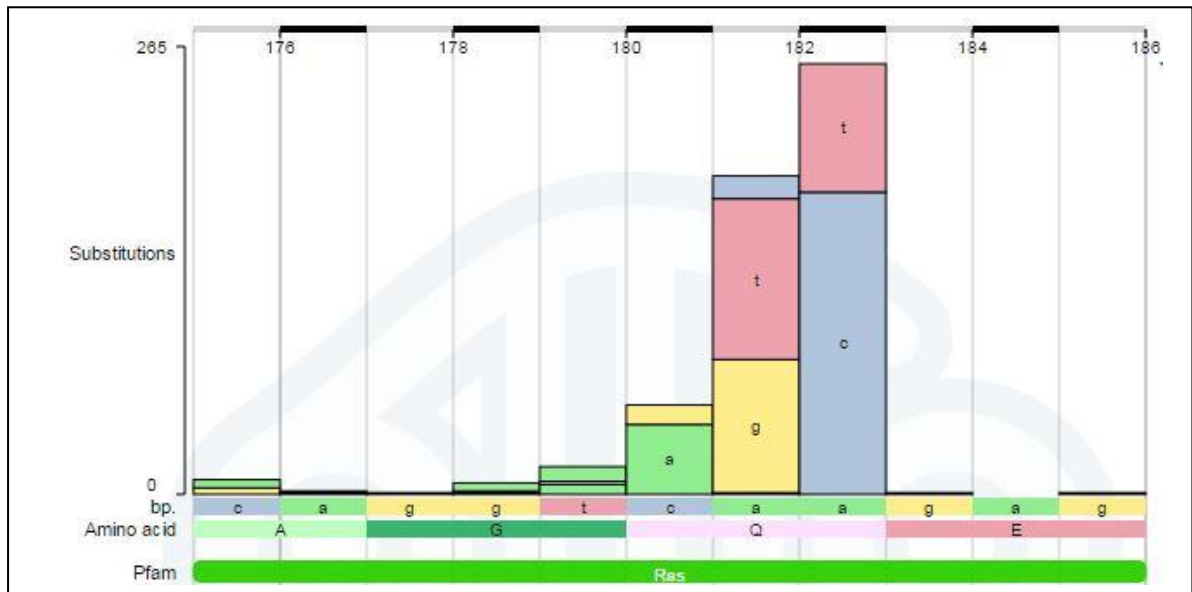


Abb. 15: Auftreten von Punktmutationen in KRAS Exon 3 (p.59, 61)
 aus: <http://cancer.sanger.ac.uk> (COSMIC) [81]

Hinsichtlich ihrer Häufigkeit treten die Punktmutationen in absteigender Reihenfolge (1-5) wie folgt auf.

c.183 A>C, p.Q61H

c.182 A>T, p.Q61L

c.182 A>G, p.Q61R

c.183 A>T, p.Q61H

c.181 C>A, p.Q61K

Die folgenden Abbildungen zeigen exemplarisch die entsprechenden Pyrogramme der in der vorliegenden Arbeit gefundenen Punktmutationen im Exon 3.

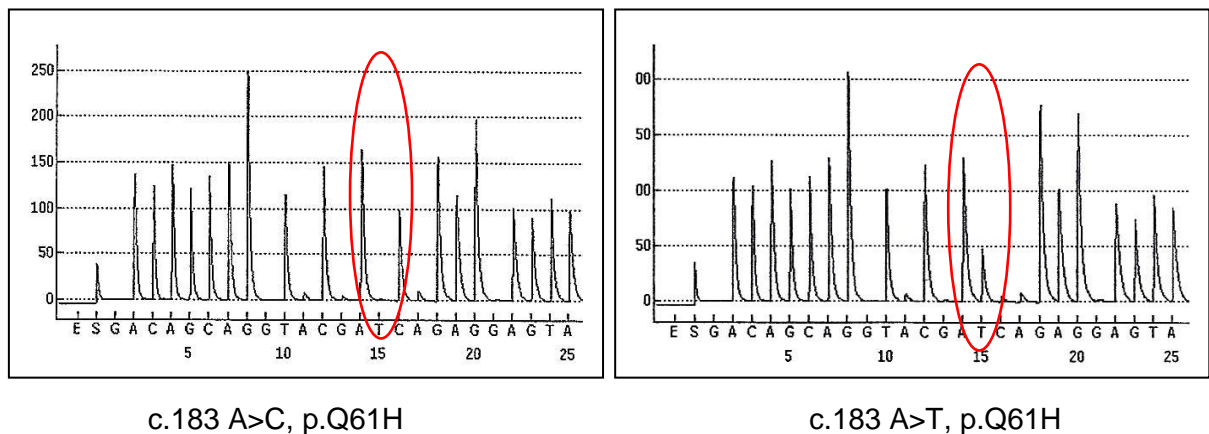


Abb. 16: Pyrogramme der gefundenen Punktmutationen in KRAS Exon 3 (p.59,61)

6.2.4.3. Exon 4, p.117

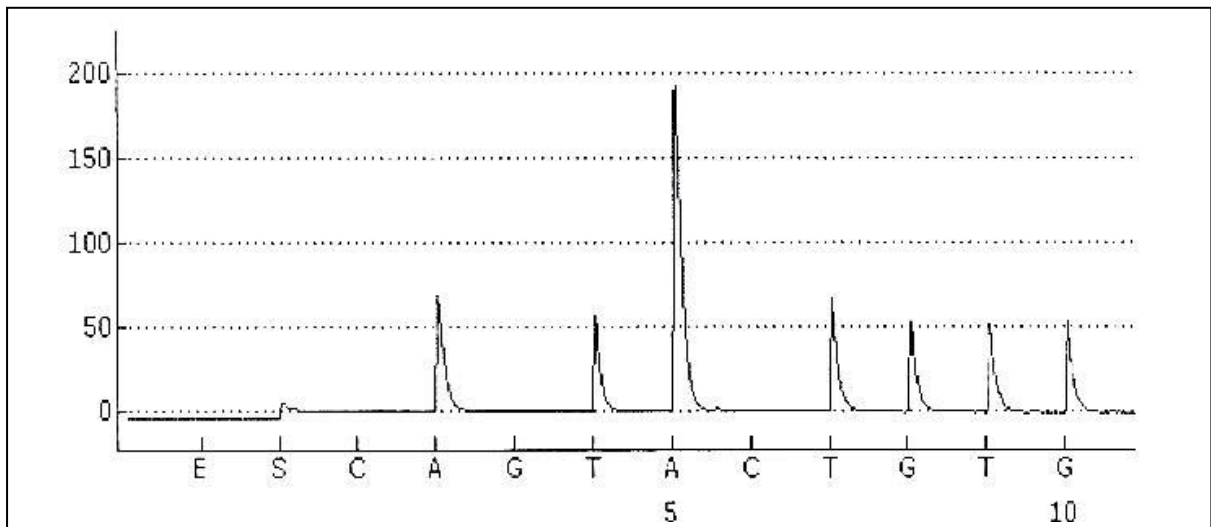


Abb. 17: KRAS, Exon 4 (p.117): Pyrogramm Wildtyp

Die spezifische Wildtyp-Sequenz im Exon 4, Codon 117 und 146 zeigen folgende Basenabfolge:

Wildtyp Exon 4, p.117: – ATAAATGT –

Die folgende Abbildung veranschaulicht in einem schematischen Säulendiagramm die Häufigkeit des Auftretens der jeweiligen Punktmutationen im KRAS-Gen, Exon 4, Codon 117.

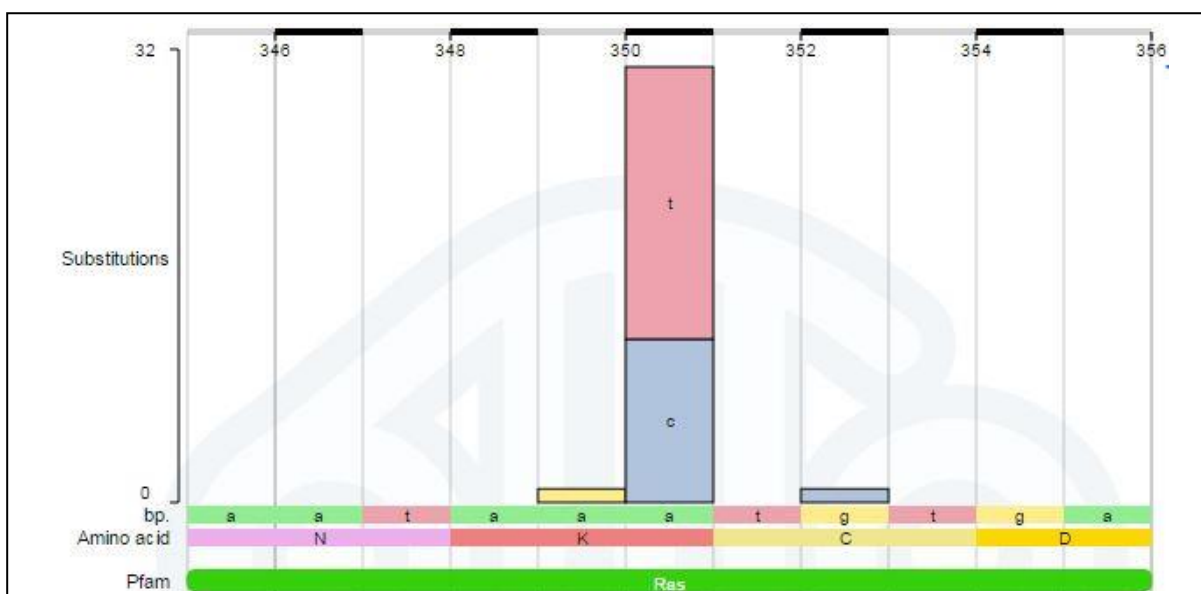


Abb. 18: Auftreten von Punktmutationen in KRAS Exon 4 (p.117)
aus: <http://cancer.sanger.ac.uk> (COSMIC) [81]

Hinsichtlich ihrer Häufigkeit treten die Punktmutationen in absteigender Reihenfolge (1-3) wie folgt auf.

c.351A>T, p.K117N

c.351 A>C, p.K117N

c.350 A>G, p.K117R

Die Analysen wiesen keine der genannten Punktmutationen nach.

6.2.4.4. Exon 4, p.146

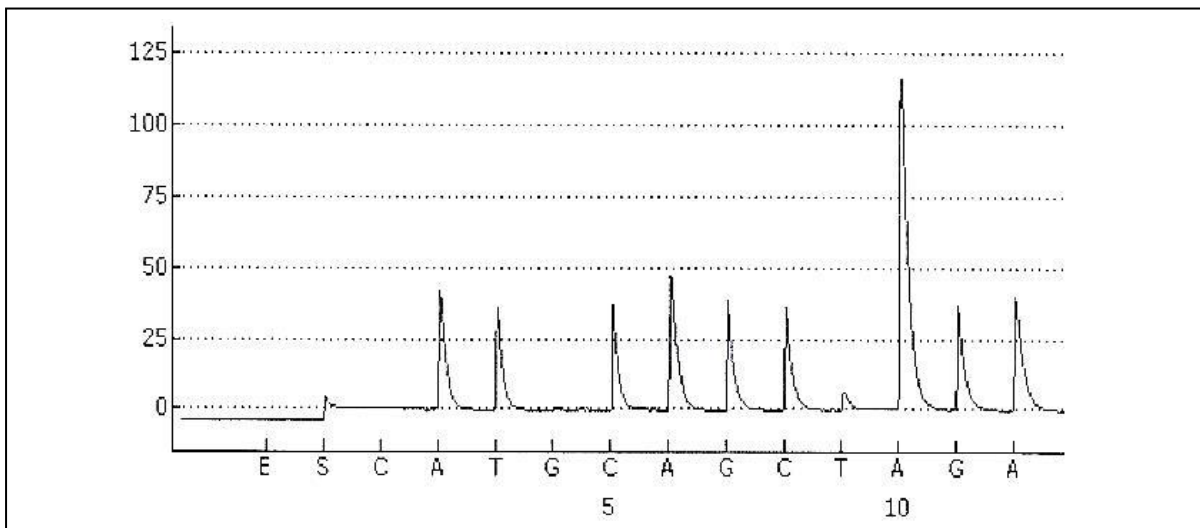


Abb. 19: KRAS, Exon 4 (p.146): Pyrogramm Wildtyp

Die spezifische Wildtyp-Sequenz im Exon 4, Codon 117 und 146 zeigen folgende Basenabfolge:

Wildtyp Exon 4, p.146: – ATCAGCAAAGA –

Die folgende Abbildung veranschaulicht in einem schematischen Säulendiagramm die Häufigkeit des Auftretens der jeweiligen Punktmutationen im KRAS-Gen, Exon 4, Codon 146.

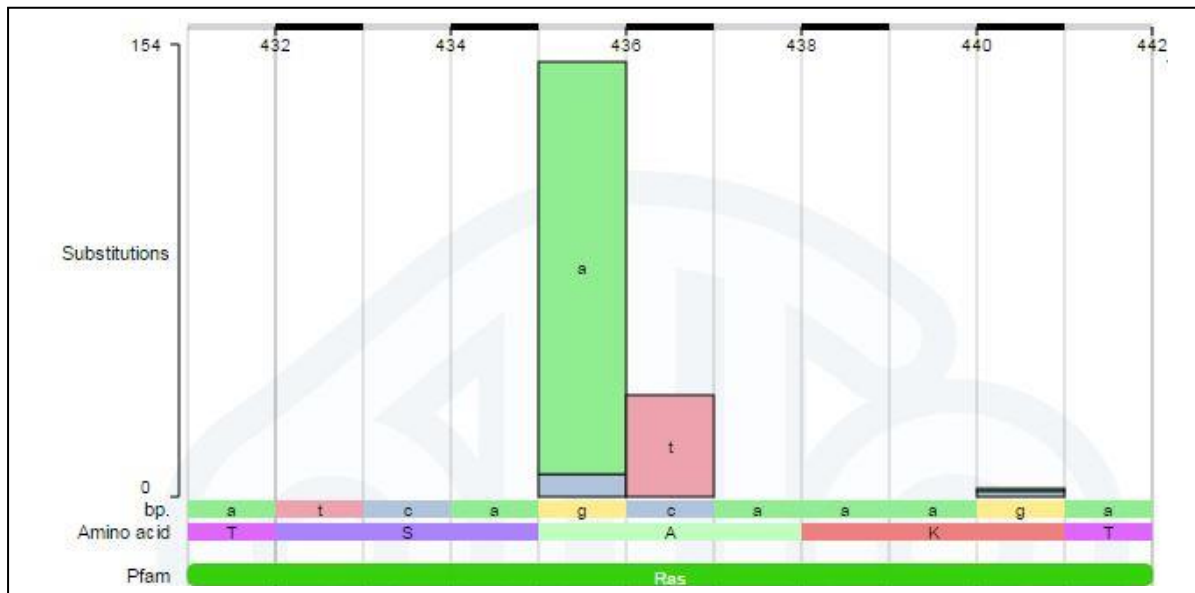


Abb. 20: Auftreten von Punktmutationen in KRAS Exon 4 (p.146)
 aus: <http://cancer.sanger.ac.uk> (COSMIC) [81]

Hinsichtlich ihrer Häufigkeit treten die Punktmutationen in absteigender Reihenfolge (1-3) wie folgt auf.

c.436 G>A, p.A146T

c.437 C>T, p.A146V

c.436 G>C, p.A146P

In den Analysen der vorliegenden Arbeit wurden keine der genannten Punktmutationen nachgewiesen.

6.2.5. Übersicht über Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Geräte

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller, Vertrieb</u>
Reagenzien	
<u>Primer:</u>	Biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland
<ul style="list-style-type: none"> • A1977 KRAS-Pyro S1 (Exon2) • A2821 KRAS p59,p61 S5 (Exon3) • A2782 KRAS Codon117 S1 und • A2791KRAS Codon146 S2 (Exon4) 	
PyroMark Annealing Buffer	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
PyroMark Binding Buffer	
PyroMark Denaturation Solution	
PyroMark Wash Buffer	
PyroMark Gold Q24 Reagent	
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit	
Streptavidin Sepharose High Performance	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
H2O Bidest	H. Kerndl GmbH, Weißenfeld, Deutschland
Ethanol ≥ 99,5%, Ph.Eur., reinst	Carl Roth GmbH & Co.KG, Deutschland
Verbrauchsmaterialien	
Platte für Beads: 24-PCR Platte ohne Rahmen	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Platte für Pyrosequenzierungsprimer: PyroMark Q24 Plate, Version 1	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
SafeSeal Reagiergefäß 2 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
<u>Pipettenspitzen:</u>	
ClearLine Filter Tips 100 µl	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, Deutschland
SafeGuard Filterspitzen 1000 µl	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
SafeSeal Tips 20 µl/ 200 µl/1000 µl	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland

Geräte- und Laborausstattung

PyroMark Q24 Cartridge	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
PyroMark Q24 Vacuum Workstation	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Mikrozentrifuge: iFuge M08VT	Neuation Technologies Pvt.Ltd, Gandhinagar, Indien
<u>Pipetten:</u>	
Pipetman classic 20 µl/ 200 µl/ 1000 µl	Gilson International B.V., Limburg an der Lahn, Deutschland
Reference 10 µl/ 100 µl/ 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Tab. 9: Übersicht über Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Geräte für die Pyrosequenzierung

Ergebnisse

1. Patientenkollektiv

1.1. Allgemeine Patientencharakteristika

Die folgende Tabelle umfasst allgemeine Patientencharakteristika sowie die entsprechenden absoluten und prozentualen Häufigkeiten (► Tab. 10).

	absolut	prozentual (%)
Patienten gesamt (n)		
	160	100,0
Alter (Jahre)		
Median	63	
Range	36 - 83	
bis 63	87	54,0
64 und älter	73	46,0
Geschlecht		
Männlich	90	56,3
Weiblich	70	43,7
Karnofsky Performance-Status (%)		
60	2	1,3
70	20	12,5
80	40	25,0
90	62	38,8
100	24	15,0
Angabe fehlt	12	7,5
CA 19-9 i.S. (U/ml)		
Median	586	
Range	0,6 – 742398,0	
< 586 U/ml	68	42,5
≥ 586 U/ml	68	42,5
Angabe fehlend	24	15,0

Tab. 10: Allgemeine Patientencharakteristika

Das insgesamt 160 Patienten umfassende Kollektiv untergliederte sich in einen prozentualen Anteil von 56,3 % männlichen (n = 90) sowie 43,7 % (n = 70) weiblichen Personen. Das mediane Alter betrug 63 Jahre, dabei waren 87 Patienten jünger (54 %) und 73 Patienten älter (64 %) als 63 Jahre. Der Großteil der Erkrankten wies einen Karnofsky Performance-Status (KPS) von zwischen 80 (n = 40) und 90 % (n = 62) auf. Bei einer kleineren Fallzahl von 24 Patienten fand sich trotz der schweren Erkrankung keine Einschränkung im Alltag, was einem KPS von 100 % entspricht. Einen stark reduzierten Allgemeinzustand mit entsprechend ausgeprägter Einschränkung in der täglichen Selbstversorgung und einem zugehörigen KPS von 60 oder 70 % zeigten jeweils 2 Patienten (1,3 % bei KPS = 60 %) und 20 Patienten (12,5 % bei KPS = 70 %). Zum Zeitpunkt vor chemotherapeutischem Therapiebeginn wiesen jeweils 68 der Patienten (42,5 %) einen CA19-9-Wert oberhalb sowie unterhalb des rechnerisch ermittelten Medianwertes von 586 U/ml auf, bei 24 der Erkrankten (15 %) fehlte die Angabe dieses Wertes.

1.2. Tumor-spezifische Patientencharakteristika sowie Therapieoptionen

Die folgende Tabelle zeigt eine Übersicht über die Tumor-spezifischen Patientencharakteristika und deren zugehörige absolute sowie prozentuale Häufigkeiten (► Tab. 11).

	absolut	prozentual (%)
Tumorlokalisation		
Pankreaskopf	96	60,0
Pankreaskörper	32	20,0
Pankreasschwanz	30	18,7
Angabe fehlend	2	1,3
Histologischer Typ		
duktales Adenokarzinom	160	100,0
TNM-Klassifikation		
TNM vorliegend	103	64,4
• klinisch (cTNM)	73	45,6
• pathologisch (pTNM)	30	18,8
Angabe fehlend	57	35,6

	absolut	prozentual (%)
Grading		
G1 (gut differenziert)	2	1,3
G2 (mäßig differenziert)	62	38,8
G3 (schlecht differenziert)	73	45,6
G4 (undifferenziert)	2	1,3
Angabe fehlend	21	13,1
Fernmetastasen bei ED		
keine Metastasen	40	25
Metastasen	120	75
Metastasierungscharakteristik		► Tabelle 12
Operative Therapie		
keine Resektion	123	76,9
Resektion mit kurativer Intention	37	23,1
Erkrankungsstadium bei Start palliative Therapie		
lokal fortgeschritten	15	9,4
metastasiert	145	90,6
Palliative Erstlinientherapie		
Gemcitabin	55	34,4
Gemcitabin + Cisplatin	43	26,9
Gemcitabin + Oxaliplatin	13	8,1
Gemcitabin + Capecitabin	21	13,1
Capecitabin	13	8,1
Capecitabin + Oxaliplatin	12	7,5
FOLFOX-6	3	1,9

Tab. 11: Tumor-spezifische Patientencharakteristika

Die histologische Untersuchung erbrachte bei sämtlichen 160 Patienten die Diagnose eines duktaalen Adenokarzinoms des Pankreas. Der Primarius des malignen Tumors war dabei mit 60 % am häufigsten (n = 96) im Pankreaskopf lokalisiert. Bei 20 % der Patienten (n = 32) und damit mit nachfolgender Häufigkeit im Pankreaskörper sowie zu 18,7 % (n = 30) im Pankreasschwanz (► Abb. 21).

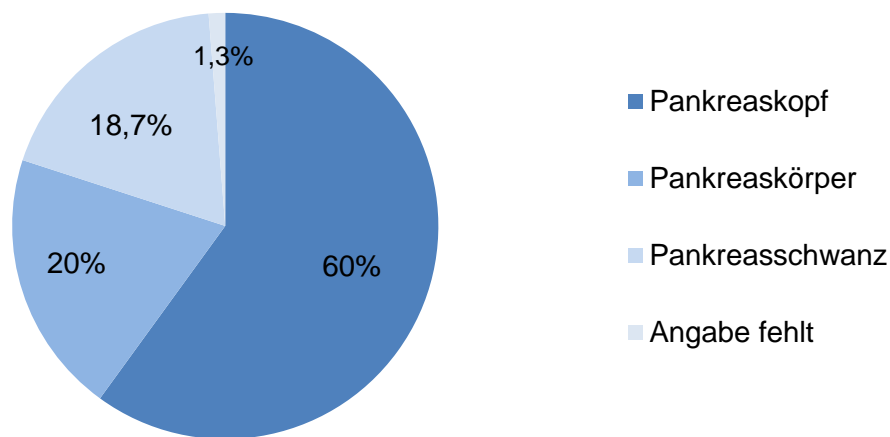


Abb. 21: Lokalisation Primarius Pankreaskarzinom

Die Mehrzahl der Primärtumore zeigten zu 45,6 % (n = 73) eine schlechte Differenzierung (G3), 38,8 % (n = 62) waren mäßig differenziert (G2), 1,3 % (n = 2) undifferenziert (G4) sowie ebenfalls 1,3 % (n = 2) gut differenziert (G1). Von den insgesamt 160 Fällen lag bei 64,4 % (n = 103) eine Klassifikation nach TNM vor. Davon wiederum sind 45,6 % lediglich durch die klinische Untersuchung gestellt worden (n = 73), bei einem nur geringeren Anteil von 18,8 % (n = 30) lagen histologisch-pathologische Kriterien vor. Bei den meisten Patienten (76,9 %, n = 123) war zum Zeitpunkt der Diagnosestellung keine operative Tumorsektion mit kurativer Intension mehr möglich. Bei 37 der Tumorkranken (23,1 %) konnte eine Operation mit Möglichkeit zur R0-Resektion durchgeführt werden. Auf die Fernmetastasierung, Metastasenlokalisation und -charakteristik (► 1.3. Häufigkeiten und Lokalisation der Fernmetastasen) sowie auf die palliative chemotherapeutische Behandlung (► 1. 4. Häufigkeiten der palliativen Chemotherapie-Schemata) wird in den folgenden Kapiteln näher eingegangen.

1.3. Häufigkeiten und Lokalisation der Fernmetastasen

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die spezifischen Charakteristika bei Fernmetastasierung sowie deren zugeordnete absolute und prozentuale Häufigkeit.

	absolut	prozentual (%)
Metastasenbefall		
1 Organ befallen	103	71
Mehrere Organe befallen	42	29
gesamt	145	100

	absolut	prozentual (%)
Metastasenlokalisation		
Lunge	7	4,4
Leber	77	48,1
Peritoneum	5	3,1
Leber + Peritoneum	8	5,0
Lunge + Leber	12	7,5
Leber + Knochen	1	0,6
Lunge + abdominelle Lymphknoten	1	0,6
Leber + Lymphknoten	13	8,1
Leber, Lunge + Lymphknoten	2	1,3
Lymphknoten	8	5,0
Leber + Nebenniere	1	0,6
Leber + Milz	1	0,6
Leber, Lunge + Peritoneum	1	0,6
Lunge, Leber + Knochen	2	1,3
keine bei Beginn der palliativen Therapie	14	8,8
sonstige	6	3,8
Angabe fehlt	1	0,6
Leberbeteiligung		
Lebermetastasierung	118	81,4
übrige Metastasierung	27	18,6

Tab. 12: Metastasencharakteristik

Bei Erstdiagnose des Tumorleidens lagen bei 75 % (n = 120) der Erkrankten bereits Fernmetastasen vor, 25 % (n = 40) der Pankreaskarzinome waren noch nicht systemisch gestreut. Bei Start der palliativen Chemotherapie zeigten schließlich bereits 90,6 % (n = 145) der Patienten eine Fernmetastasierung, bei nur 9,4 % (n = 15) der Patienten war das Karzinom lokal fortgeschritten (► Abb. 22). Dabei lagen zu 71% (n = 103) die Tumorabsiedelungen in nur einem Organ vor. Bei 42 der Fälle fanden sich in zwei oder mehr Organen Metastasen (29%) (► Abb. 23).

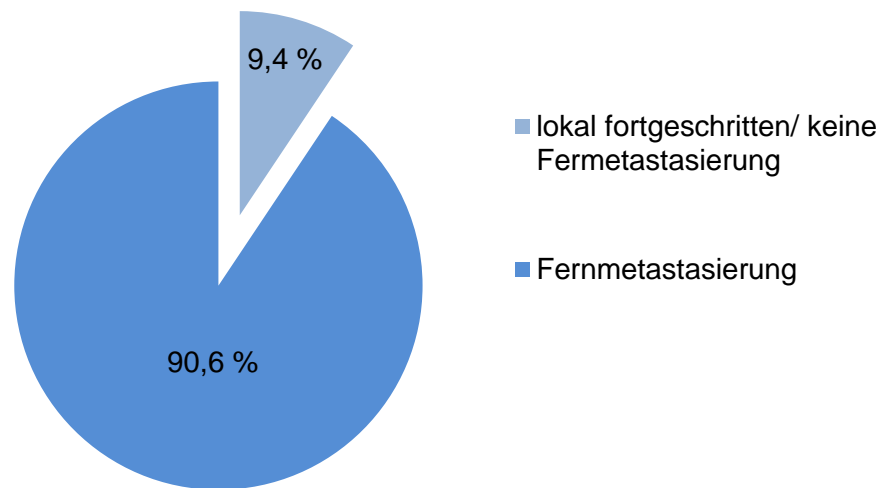


Abb. 22: Erkrankungsstadium bei Beginn palliative Chemotherapie

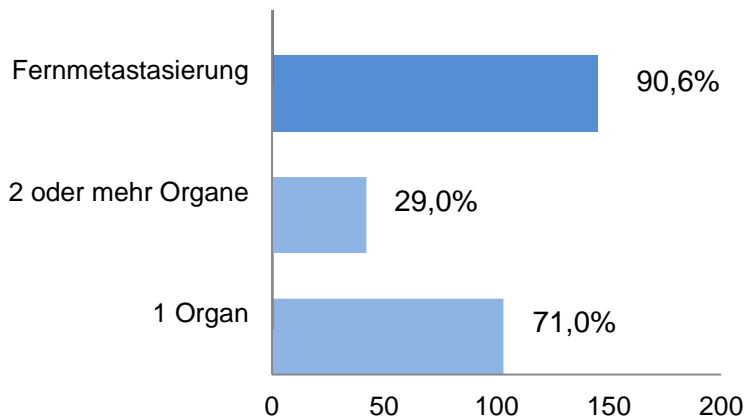


Abb. 23: Anzahl betroffener Organe im Fall der Fernmetastasierung

Der am häufigsten von der hämatogenen Streuung betroffene Lokalisationsort war mit 81,4 % (n = 118) die Leber. Sowohl bei einer Fernmetastasierung in nur ein Organ, als auch bei multiplen Organlokalisationen war das Oberbauchorgan am häufigsten beteiligt. Bei 48,1 % der Patienten (n = 77) lag eine isolierte Fernmetastasierung in die Leber vor. Mit nachfolgender Häufigkeit fanden sich bei 8,1 % (n = 13) zeitgleich Metastasen in Leber und regionären Lymphknoten, bei 7,5 % (n = 12) gleichzeitig in Leber und Lunge. Bei 14 Patienten (8,8 %) lagen zum Zeitpunkt des Beginns der palliativen Chemotherapie keine Fernmetastasen vor. Das folgende Diagramm veranschaulicht die Häufigkeit und Organlokalisation der aufgetretenen Tumorstreuung (► Abb. 24).

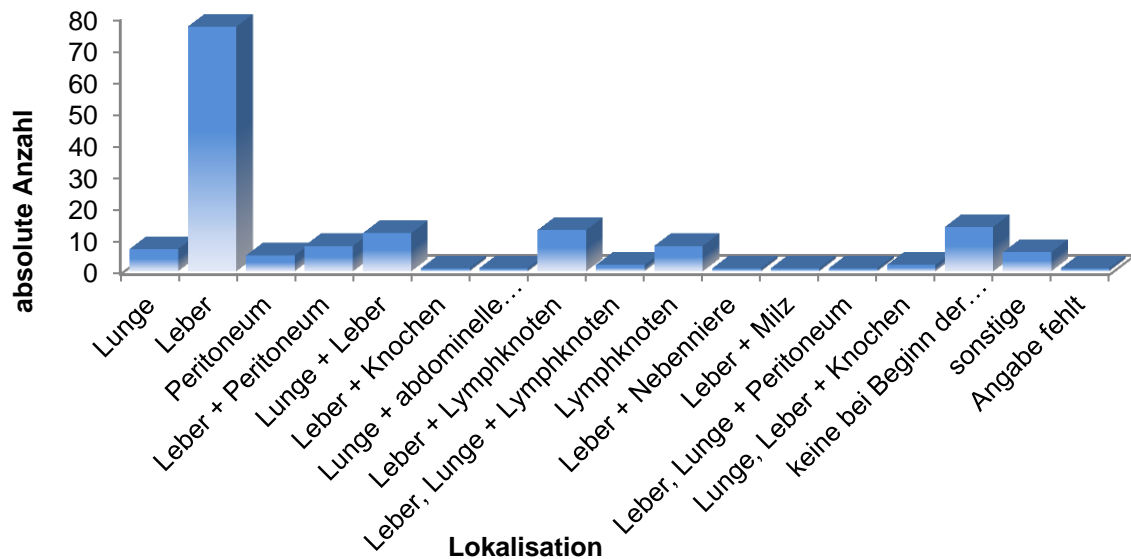


Abb. 24: Lokalisation Fernmetastasen und absolute Anzahl

1.4. Häufigkeiten der palliativen Chemotherapie - Schemata

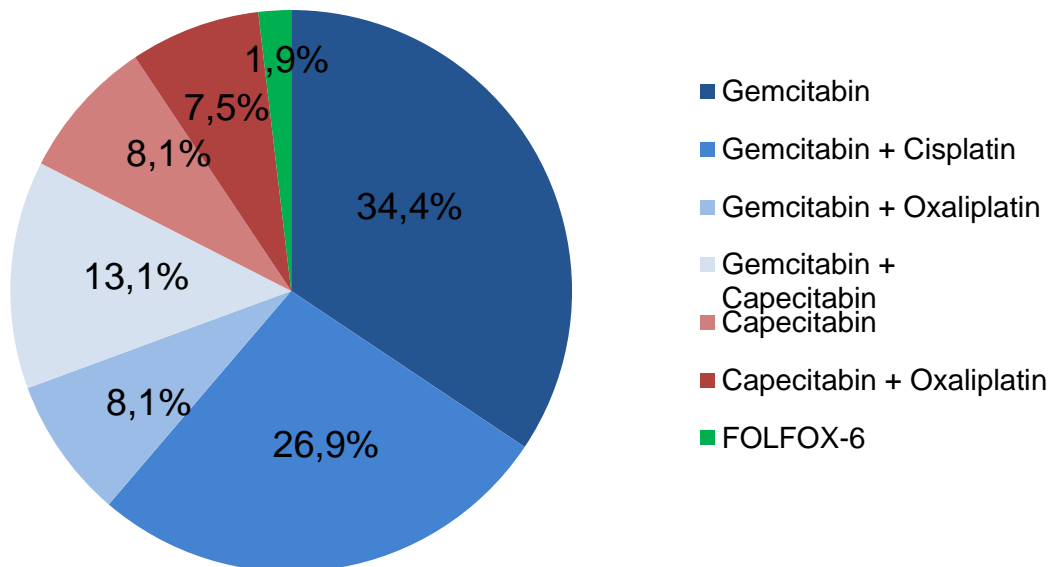


Abb. 25: Prozentuale Anteile palliative Chemotherapeutika

Zentrales Einschlusskriterium war ein Chemotherapie-Schema ohne Kombination mit Erlotinib. Dabei erhielt der größte Teil von 55 Patienten (34,4%) Gemcitabin als Monotherapie im Sinne einer Möglichkeit der Erstlinien-Therapie. Bei 77 Patienten (27%) erfolgte eine auf Gemcitabin basierende Kombinationstherapie. Hierbei erhielten die Patienten zusätzlich Cisplatin (in 43 Fällen, 26,9%), Capecitabin (n = 21, 13,1%) oder

Oxaliplatin (n = 13, 8,1%). Als eine weitere Form der Monotherapie wurde bei 13 Patienten (8,1%) das Zytostatikum Capecitabin herangezogen. In 12 Fällen wurde Capecitabin mit Oxaliplatin kombiniert. Nur 3 der Patienten (1,9%) wurden mit dem Schema FOLFOX-6 behandelt.

2. KRAS-Mutationsstatus

2.1. Übersicht und Häufigkeiten der KRAS-Mutationen

	absolut	prozentual (%)
KRAS-Mutationsstatus Exon 2, 3 und/oder 4		
Wildtyp	35	21,9
Mutation in Exon 2, 3 oder 4	125	78,1
Gesamtanzahl (n)	160	100

Tab. 13: Häufigkeiten Wildtyp/ Mutation in KRAS Exon 2, 3 und/oder 4

Insgesamt zeigte sich bei der Analyse des KRAS-Mutationsstatus in 125 Fällen (78,1%) eine Punktmutation im KRAS-Gen. Im Falle einer Mutation lag diese entweder im Exon 2 oder im Exon 3 vor, im Exon 4 wurden keine Mutationen gefunden. Bei 35 der Patienten (21,9%) konnte in der Tumor-spezifischen DNA keine Punktmutation nachgewiesen werden, hier lag eine Wildtyp-Sequenz vor. Bei Auftreten einer Mutation im Exon 2 zeigten sich keine zusätzlichen Mutationen im Exon 3 oder Exon 4 et vice versa.

Bei 74,4% der Karzinom-DNA (n = 119) und damit bei der überwiegenden Mehrheit fand sich eine Punktmutation im Exon 2. Nur bei einem kleinen Anteil von 4% und damit einer absoluten Zahl von 6 Patientenfällen konnte sich eine Mutation im Exon 3 nachweisen lassen. Die folgende Tabelle (► Tab. 14) sowie die nachstehende Abbildung (► Abb. 26) veranschaulichen die Häufigkeit des Auftretens von Mutationen im KRAS-Gen und deren Verteilung auf die Exons 2, 3 und 4.

	absolut	prozentual (%)
KRAS Mutation in Exon 2 oder 3		
Mutation in Exon 2	119	74,4
Mutation in Exon 3	6	3,7
Mutation in Exon 4	0	0,0
Gesamtanzahl (n)	125	78,1

Tab. 14: Verteilung der gefundenen Punktmutationen auf die Exons des KRAS-Gen

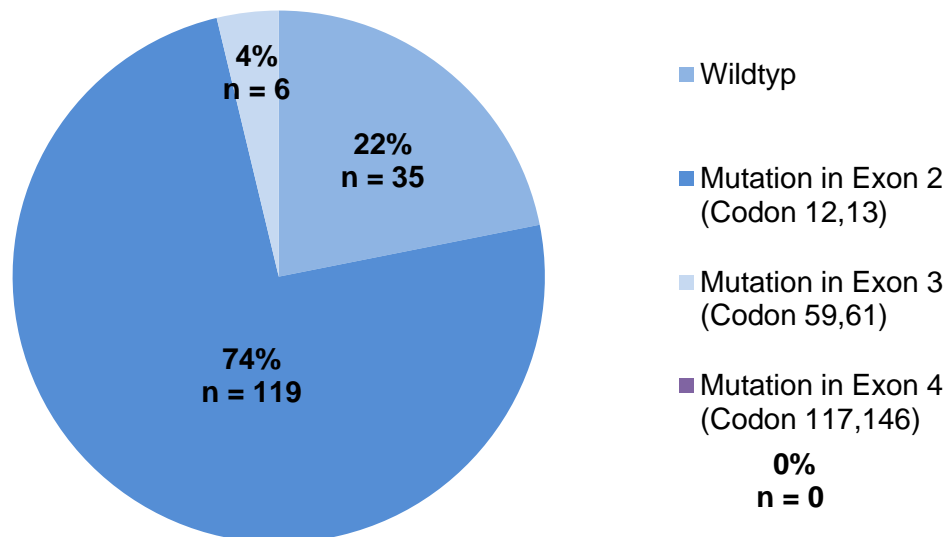


Abb. 26: Übersicht KRAS-Mutationsstatus in prozentualer Verteilung und absoluter Anzahl

Im den folgenden Unterkapiteln werden die Häufigkeiten des Auftretens von KRAS-Mutationen in den Exons 2, 3 und 4 sowie die jeweils gefundenen, spezifischen Punktmutationen entgegen dem Auftretens eines Wildtyps tabellarisch aufgeführt.

2.1.1. Exon 2, Codon 12/13

	absolut	prozentual (%)
KRAS-Mutationsstatus Exon 2 (Codon 12, 13)		
Wildtyp	41	25,6
Mutation in Exon 2	119	74,4
Gesamtanzahl (n)	160	100

Tab. 15: Häufigkeiten Wildtyp/ Mutation in KRAS Exon 2

Bei der Sequenzierung der Karzinom-DNA war mit 74,4% der größte Anteil der Tumorgewebeproben (n = 119) im Exon 2 an einer Stelle der kodierenden Basenabfolge punktmuiert. In 25,6% (n = 41), wurde keine Mutation im entsprechenden Genabschnitt nachgewiesen. Dabei traten die Punktmutationen an fünf verschiedenen Stellen der Basenabfolge des Exons 2 auf. Die Anzahl sowie der jeweilige prozentuale Anteil ist der folgenden Tabelle zu entnehmen (► Tab. 16).

	absolut	prozentual (%)
Punktmutationen in Exon 2 (Codon 12, 13)		
c.35 G>A – p.G12D (Aspartat)	58	36,3
c.35 G>T – p.G12V (Valin)	41	25,6
c.34 G>T – p.G12C (Cystein)	2	1,3
c.34 G>C – p.G12R (Arginin)	17	10,6
c.38 G>A – p.G13D (Aspartat)	1	0,6
Gesamtanzahl (n)	119	100

Tab. 16: Häufigkeiten der Punktmutationen in Exon 2

Die am häufigsten nachgewiesene Punktmutation G12D (C.35 G>A – p.G12D (Aspartat)) trat mit 36,3% (n = 58) im Codon 12 auf. Hierbei liegt ein Basenaustausch von Guanin zu Adenin vor. An zweiter Stelle folgte mit 25,6% (n = 41) die Mutation G12V (C.35 G>T – p.G12V (Valin)), welche ebenfalls in Codon 12 zu einem Austausch von Guanin zu Thymin führt. Zu 10,6% (n = 17) ließ sich die Punktmutation G12R (C.34 G>C – p.G12R (Arginin)) im Codon 12 nachweisen, bei welcher Guanin zu Cytosin ersetzt ist. In nur zwei Fällen (1,3%) zeigte sich die Punktmutation G12C (C.34 G>T – p.G12C (Cystein)). In Codon 13 wurde unter den 119 Fällen nur einmal (0,6 %) eine Mutation gefunden (C.38 G>A – p.G13D (Aspartat)). Das folgende Säulendiagramm veranschaulicht die Häufigkeiten der aufgetretenen Punktmutationen in Exon 2, Codon 12/13 (► Abb. 27).

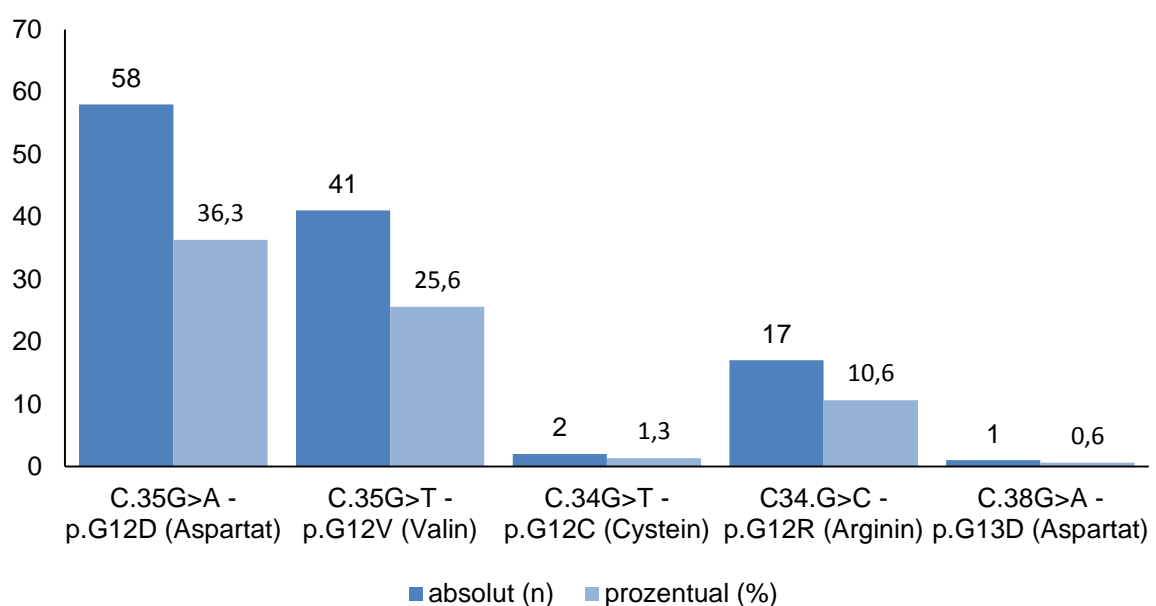


Abb. 27: Säulendiagramm Häufigkeiten der Punktmutationen in Exon 2

2.1.2. Exon 3, Codon 59/61

	absolut	prozentual (%)
KRAS-Mutationsstatus Exon 3 (Codon 59, 61)		
Wildtyp	154	96,3
Mutation in Exon 3	6	3,7
Gesamtanzahl (n)	160	100

Tab. 17: Häufigkeiten Wildtyp/ Mutation in KRAS Exon 3

Bei der Analyse von Exon 3 des KRAS-Gens lag in der überwiegenden Mehrzahl von 154 Fällen (96,2%) ein Wildtyp vor. Nur in 3,7%, was einer absoluten Zahl von 6 Fällen entspricht, zeigte sich eine Mutation im entsprechenden Genabschnitt (► Tab. 17). In der nachfolgenden Tabelle sind die beiden im Kollektiv vorkommenden Punktmutationen dargestellt (► Tab. 18).

	absolut	prozentual (%)
Punktmutationen in Exon 3 (Codon 59, 61)		
c.183 A>C – p.Q61H	5	83,3
c.183 A>T – p.Q61H	1	16,7

Tab. 18: Häufigkeiten der Punktmutationen in Exon 3

Im Falle einer Mutation im Exon 3 des KRAS-Gens zeigte sich in 83,3% der Fälle (n = 5) die Punktmutation Q61H. Hier liegt im Codon 61 durch Mutation ein Austausch von Adenin gegen Cytosin vor.

2.1.3. Exon 4, Codon 117/146

Im gesamten Kollektiv wurden im Exon 4 des KRAS-Gens keine Mutationen nachgewiesen. Sowohl in Codon 117, als auch in Codon 146 zeigte das Tumormaterial einen Status Wildtyp.

3. Univariate Analysen

3.1. Korrelation klinischer Parameter mit Gesamtüberleben

Es wurden univariate Analysen zu verschiedenen klinischen Parametern durchgeführt, welche als potentielle prognostische Faktoren Einfluss auf das Gesamtüberleben der Erkrankten nehmen können. Zum einen erfolgten Auswertungen zu verschiedenen Patientencharakteristika wie Geschlecht oder Alter der Patienten, dem Allgemeinzustand der Patienten mittels dem spezifischen Karnofsky-Status und zusätzlich dem CA19-9-Wert. Zum anderen wurden Tumor-spezifische Charakteristika wie das Tumorstadium sowie das Metastasierungsverhalten des Pankreaskarzinoms in Korrelation mit dem Überleben untersucht.

3.1.1. Geschlecht

<i>Geschlecht</i>	Gesamtzahl (n = 160)	OS in Monaten (Median)	P-Wert (log-Rank)
männlich	90	8,31	0,51
weiblich	70	8,27	

Tab. 19: Statistische Daten Geschlecht

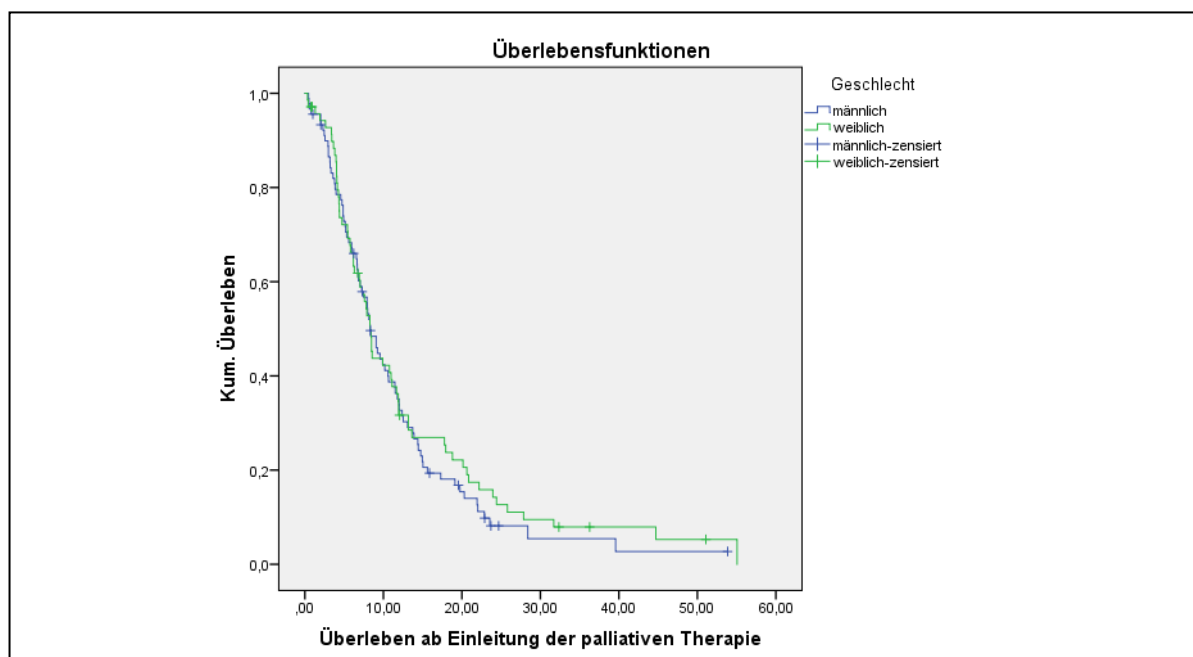


Abb. 28: Kaplan-Meier-Kurve: Korrelation Geschlecht mit dem Überleben

Kurve blau: männlich, Kurve grün: weiblich;

Hinsichtlich des Geschlechts konnte zwischen Männern oder Frauen kein statistisch signifikanter Unterschied im Überleben aufgezeigt werden (p-Wert = 0,51).

3.1.2. Alter

<i>Alter</i>	Gesamtzahl (n = 160)	OS in Monaten (Median)	P-Wert (log-Rank)
bis 63	87	8,27	0,43
64 und älter	73	9,23	

Tab. 20: Statistische Daten Alter

Orientiert nach dem medianen Alter von 63 Jahren erfolgte eine Einteilung der Patienten in zwei Gruppen, wobei der einen Gruppe ein Alter bis einschließlich 63 Jahre zugeordnet wurde und die Personen der anderen Gruppe mindestens 64 Jahre alt waren. Hinsichtlich des mittleren Überlebens der beiden ‚Patientenkohorten‘ zeichnete sich ein geringer Überlebensvorteil der älteren Gruppe ab, welcher bei einem p-Wert von 0,43 jedoch keine statistische Signifikanz erreichte.

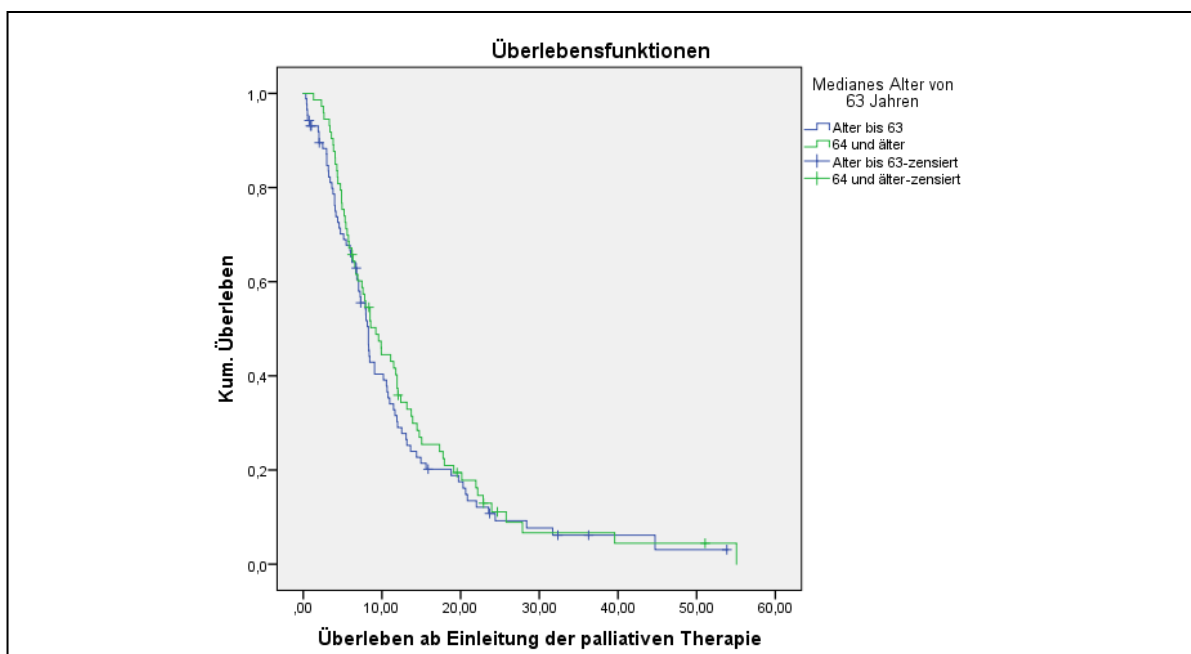


Abb. 29: Kaplan-Meier-Kurve: Korrelation Alter mit Überleben
Kurve blau: Alter bis 63, Kurve grün: 64 Jahre und älter;

3.1.3. Karnofsky Performance-Status

Neben Geschlecht und Alter wurde auch der Karnofsky Performance-Status, welcher den Allgemeinzustand der Patienten widerspiegelt, untersucht. Hierbei erfolgte der Vergleich von Patienten mit einem höheren KPS (KPS 90 – 100%) mit denjenigen Erkrankten, welche einen niedrigeren KPS-Wert (60 – 80%) aufwiesen. Die Analyse erbrachte hier einen statistisch signifikanten Unterschied im Überleben, wobei die Patientengruppe mit dem besseren Allgemeinzustand ein längeres mittleres Überleben aufzeigte. Nach Auswertung des log-Rank-Tests lag der p-Wert bei 0,007.

KPS	Gesamtzahl (n = 148)	OS in Monaten (Median)	HR (95% CI)	P-Wert (log-Rank)
60 – 80%	62	6,7	0,617 (0,43 – 0,88)	0,007
90 – 100%	86	11,5		

Tab. 21: Statistische Daten KPS

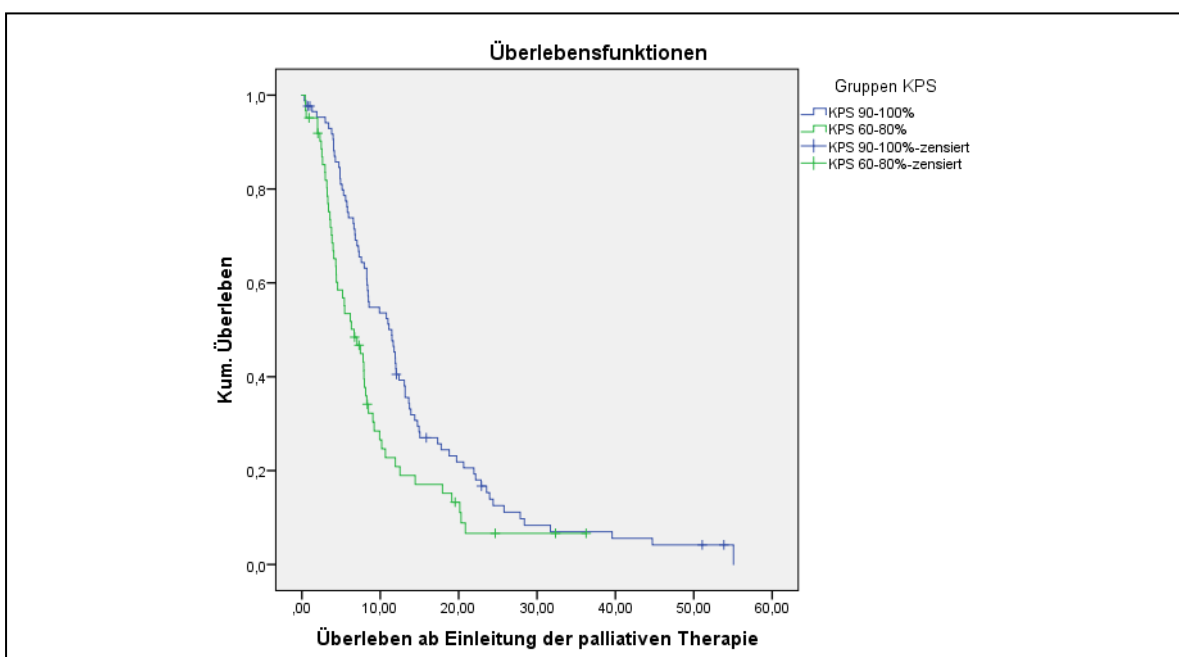


Abb. 30: Kaplan-Meier-Kurve: Korrelation KPS mit Überleben

Kurve blau: KPS 90 – 100%, Kurve grün: KPS 60 – 80%;

3.1.4. CA 19-9 im Serum

Zudem wurde der klinisch-chemischer Parameter CA19-9 im Serum hinsichtlich des Überlebens untersucht. Unter Betrachtung des zum Zeitpunkt vor Therapiebeginn bestehenden CA19-9-Medianwertes von 586 U/ml erfolgte dabei eine Einteilung der

Patienten in zwei große Subgruppen. Beiden Gruppen waren jeweils 68 der Patienten zugeordnet. Hinsichtlich des Gesamtüberlebens zeichnete sich ein geringer Unterschied zwischen beiden Gruppen ab, wobei die Patienten mit den niedrigeren CA19-9-Werten eine bessere Lebenserwartung zeigten. Allerdings lag der p-Wert hier bei 0,25, wodurch der Unterschied keine statistische Signifikanz erreichte.

CA19-9 i. Serum	Gesamtzahl (n = 136)	OS in Monaten (Median)	HR (95% CI)	P-Wert (log-Rank)
< 586 U/ml	68	9,9	0,811 (0,56 – 1,16)	0,25
≥ 586 U/ml	68	7,6		

Tab. 22: Statistische Daten CA 19-9 im Serum

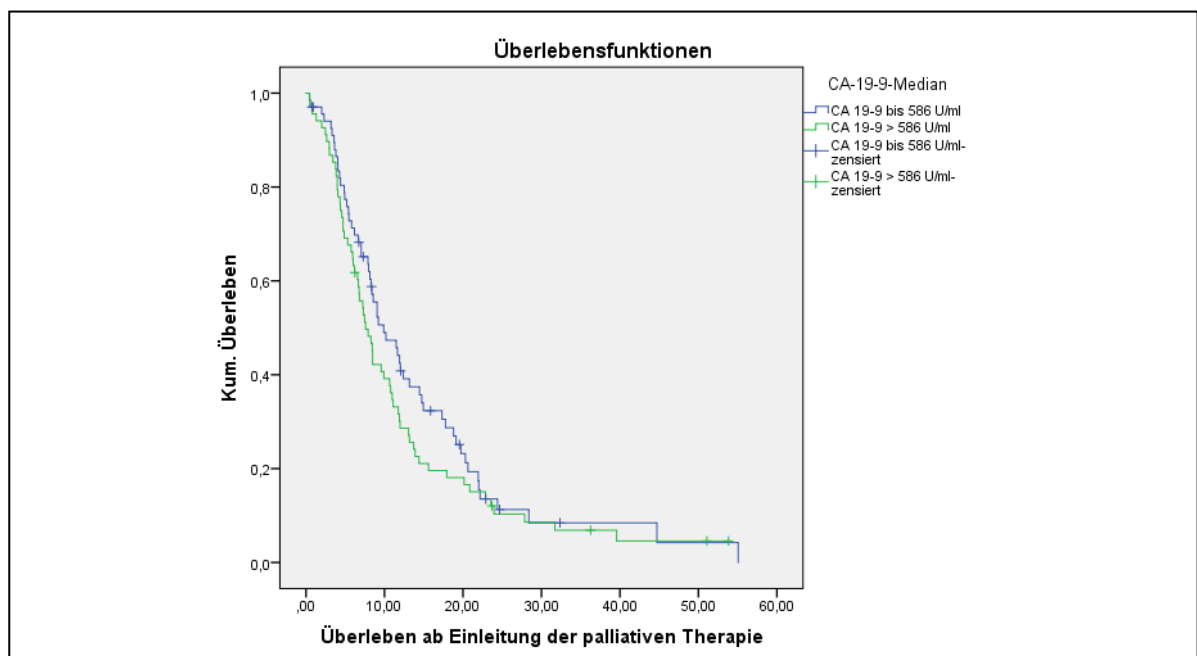


Abb. 31: Kaplan-Meier-Kurve: Korrelation CA19-9 im Serum mit Überleben
Kurve blau: CA 19-9 ≤ 589 U/ml, Kurve grün: CA 19-9 > 586 U/ml;

3.1.5. Tumorstadium

Auf Grund der hohen Frequenz von Fernmetastasierungen wurde zudem der Einfluss des Status einer systemischen Metastasierung im Vergleich zu einem lokal fortgeschrittenen Stadium des Karzinoms auf die mittlere Überlebensdauer der Patienten analysiert. Dabei zeigte sich in der Zusammenschau ein Überlebensvorteil für Erkrankte mit lokal fortgeschrittenen Karzinomen. Die hierbei ermittelte Differenz war deutlich, jedoch nicht statistisch signifikant. Der p-Wert lag bei 0,07.

<i>Tumorstadium</i>	Gesamtzahl (n = 160)	OS in Monaten (Median)	HR (95% CI)	P-Wert (log-
lokal fortgeschritten	15	13,3	1,76 (0,95 – 3,26)	0,07
metastasiert	145	8,3		

Tab. 23: Statistische Daten Tumorstadium bei Start palliativer Therapie

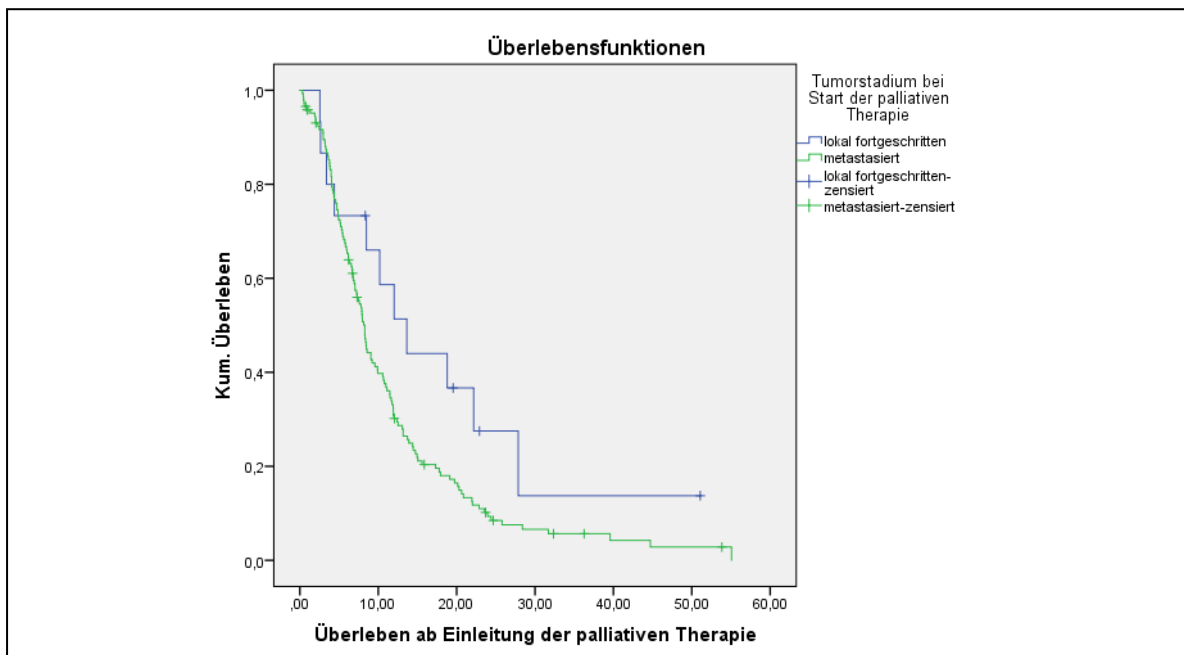


Abb. 32: Kaplan-Meier-Kurve: Korrelation Tumorstadium bei Start palliative Therapie mit Überleben
Kurve blau: lokal fortgeschritten, Kurve grün: metastasiert;

3.1.6. Metastasierung

Zudem wurde hinsichtlich des Überlebens der Status der Anzahl von Fernmetastasen betroffenen Organen verglichen. Aus den beiden sich gegenüber gestellten Gruppen ergaben sich einmal die Patienten mit Metastasenbefall eines Organs gegenüber derer mit Beteiligung mehrerer Organe (► Tab. 24). Die statistische Auswertung im Log Rank-Vergleich ergab hier keine statistische Signifikanz bei einem p-Wert von 0,63.

<i>Metastasenbefall</i>	Gesamtzahl (n = 145)	OS in Monaten (Median)	P-Wert (log-Rank)
1 Organ	103	8,3	0,63
Mehrere Organe	42	7,8	

Tab. 24: Häufigkeiten Metastasenbefall hinsichtlich Anzahl Organe

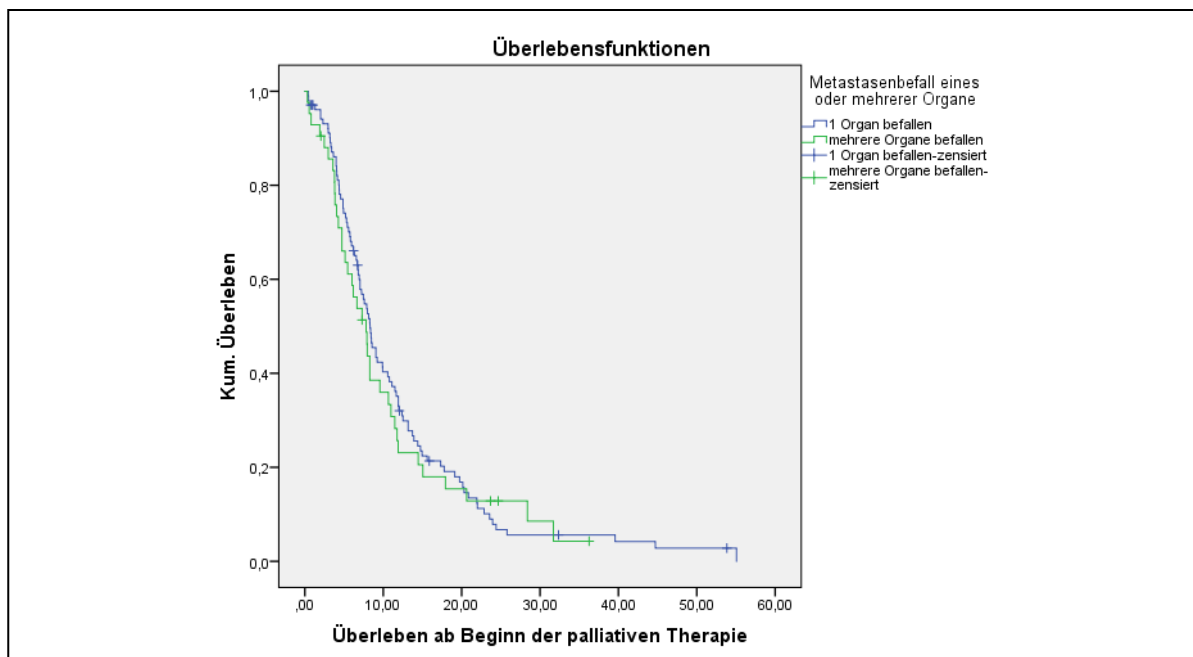


Abb. 33: Kaplan-Meier-Kurve: Korrelation Metastasenbefall eines oder mehrerer Organe mit Überleben
Kurve blau: Befall eines Organs, Kurve grün: Befall mehrerer Organe

Hinsichtlich der spezifischen Organlokalisierung der Fernmetastasen erfolgte außerdem zusätzlich eine Analyse der Korrelation des Überlebens bei einer Fernmetastasierung mit oder ohne Leberbeteiligung. Hier zeigte sich ein deutlicher Unterschied im Überleben, wenn auch kein Unterschied mit statistisch signifikanter Relevanz. Der p-Wert lag bei 0,061.

Metastasenbefall	Gesamtzahl	OS in Monaten (Median)	P-Wert (log-Rank)
Lebermetastasierung			0,061
1 Organ	77	7,9	
mehrere Organe	41	9,9	
gesamt	118	8,3	
übrige Metastas.			
1 Organ	103	7,8	
mehrere Organe	42	15,0	
gesamt	145	7,8	

Tab. 25: Statistische Daten Leberbeteiligung

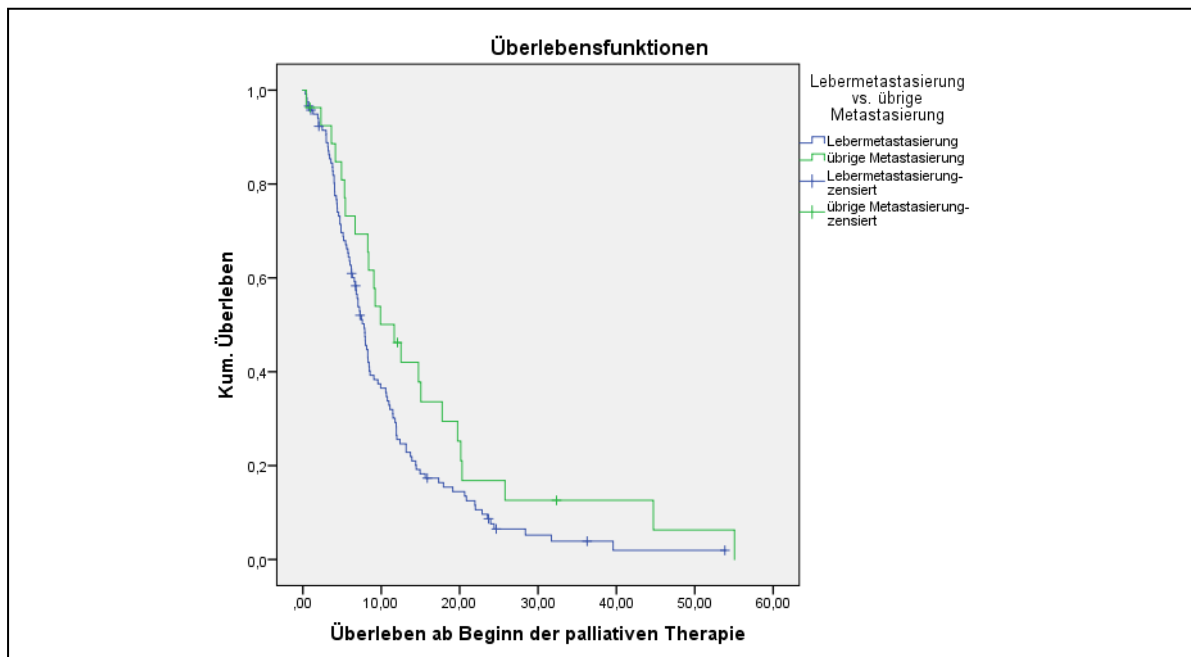


Abb. 34: Kaplan-Meier-Kurve: Korrelation Leber- vs. übrige Metastasierung mit dem Überleben
Kurve blau: Lebermetastasierung, Kurve grün: übrige Metastasierung;

3.2. Korrelation KRAS-Mutation mit Gesamtüberleben

3.2.1. Mutation in Exon 2

Hinsichtlich des Gesamtüberlebens im Vergleich zwischen dem Status Wildtyp und dem Status Mutation im Exon 2 des KRAS-Gens konnte kein signifikanter Unterschied im Überleben aufgezeigt werden. Bei einem Signifikanzniveau von 5% lag der p-Wert bei 0,74 (► Tab. 26). Die nachstehende Tabelle zeigt die statistischen Daten, die darauf folgende Kaplan-Meier-Kurve den entsprechenden Verlauf hinsichtlich des Überlebens (► Abb. 34).

<i>Exon 2</i>	OS in Monaten (Median)	HR (95% CI)	P-Wert (log-Rank)
Wildtyp	9,6	1,07 (0,73 – 1,55)	0,74
Mutation	8,3		

Tab. 26: Statistische Daten Status Exon 2

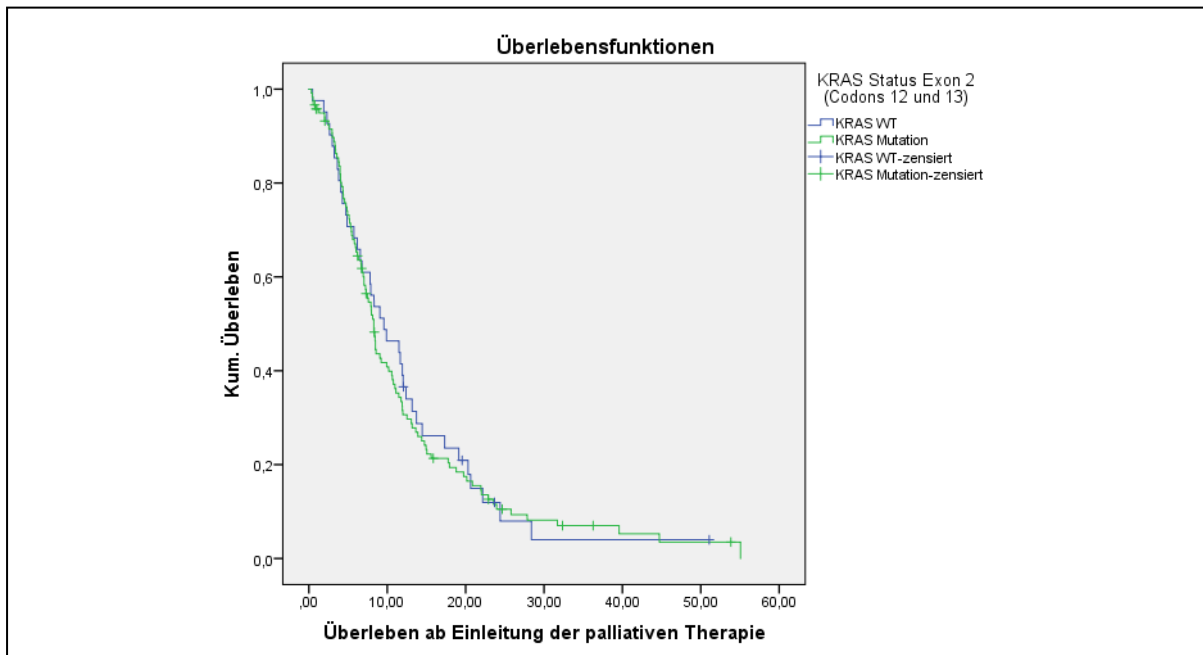


Abb. 35: Kaplan-Meier-Kurve: Korrelation Wildtyp oder Mutation in Exon 2 mit Überleben
Kurve blau: KRAS WT, Kurve grün: KRAS Mutation

3.2.2. Subtypisierung nach Punktmutationen in Exon 2

Um hinsichtlich des Überlebens einen möglicherweise differierenden Verlauf zwischen den einzelnen Punktmutationen in Exon 2, des KRAS-Gens zu erkennen, wurde auch hierzu eine Kaplan-Meier-Kurve erstellt. Hier zeigten sich deutlich unterschiedliche Verläufe nicht nur im Vergleich der Punktmutationen mit dem Wildtyp, sondern auch zwischen den verschiedenen Submutationen. Bei einem p-Wert von 0,122 waren die Unterschiede im Überleben dennoch nicht statistisch signifikant (► Tab. 27).

<i>Punktmutationen Exon 2</i>	OS in Monaten (Median)	P-Wert (log-Rank)
G12D	7,9	0,122
G12V	7,5	
G12R	11,9	
Wildtyp	9,9	

Tab. 27: Statistische Daten Punktmutationen in Exon 2

Die Überlebensverläufe der drei am häufigsten gefundenen Punktmutationen ($n > 2$) im Vergleich zum Wildtyp können der folgenden Kaplan-Meier-Kurve entnommen werden.

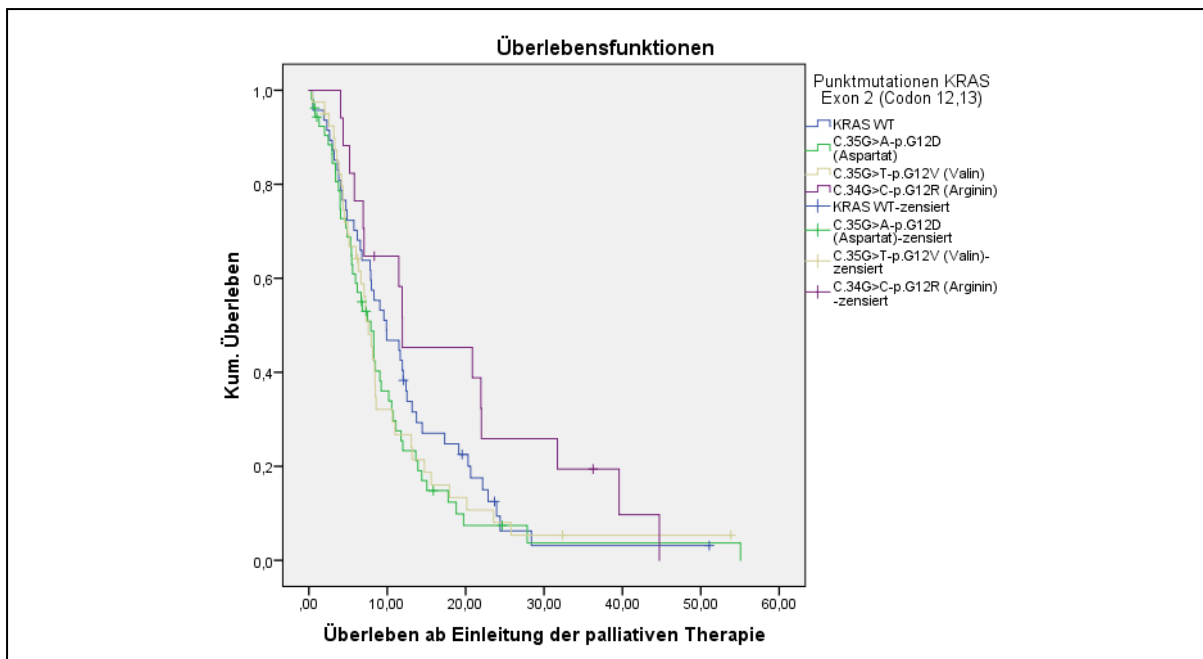


Abb. 36: Kaplan-Meier-Kurve: Korrelation Wildtyp oder jeweilige Punktmutationen in Exon 2 mit Überleben

Kurve blau: KRAS WT, Kurve grün: C.35G>A-p.G12D, Kurve grau: C.35G>T-p.G12V, Kurve lila: C.34G>C-p.G12R;

Zur genaueren Differenzierung erfolgte eine Vergleichsanalyse der Überlebenskurven mit den am weitesten auseinander liegenden Überlebensdaten. Hierzu erfolgte eine Einteilung in sogenannte prognostische Gruppen. Dabei wurden die Punktmutationen G12D und G12V zusammengefasst und deren gemeinsamer, ähnlicher Verlauf im Überleben einerseits mit dem des Wildtyps sowie andererseits mit dem der Punktmutation G12R verglichen.

Prognostische Gruppen	OS in Monaten (Median)	P-Wert (log-Rank)
G12R	11,9	0,059
Wildtyp	9,9	
G12D + G12V	7,6	

Tab. 28: Statistische Daten Prognostische Gruppen

Prognostische Gruppen	OS in Monaten (Median)	P-Wert (log-Rank)
G12R	11,9	0,031
G12D + G12V	7,6	

Tab. 29: Statistische Daten Prognostische Gruppen ohne Wildtyp

Bei Miteinbeziehen des Wildtyps ergab sich ein knapp nicht statistisch signifikanter Unterschied im Überleben (p-Wert = 0,059; ► Tab. 28). Beim Vergleich der Punktmutationsgruppen unter Ausschluss des WT konnte ein statistisch signifikanter Überlebensvorteil der Mutation G12R gegenüber der Gruppe bestehend aus den Mutationen G12D und G12V, erfasst werden. Bei einem Signifikanzniveau von 5% lag hier der p-Wert bei 0,031 (► Tab. 29). Die folgenden Kaplan-Meier-Darstellungen zeigen die entsprechenden Überlebenskurven (► Abb. 37, Abb. 38).

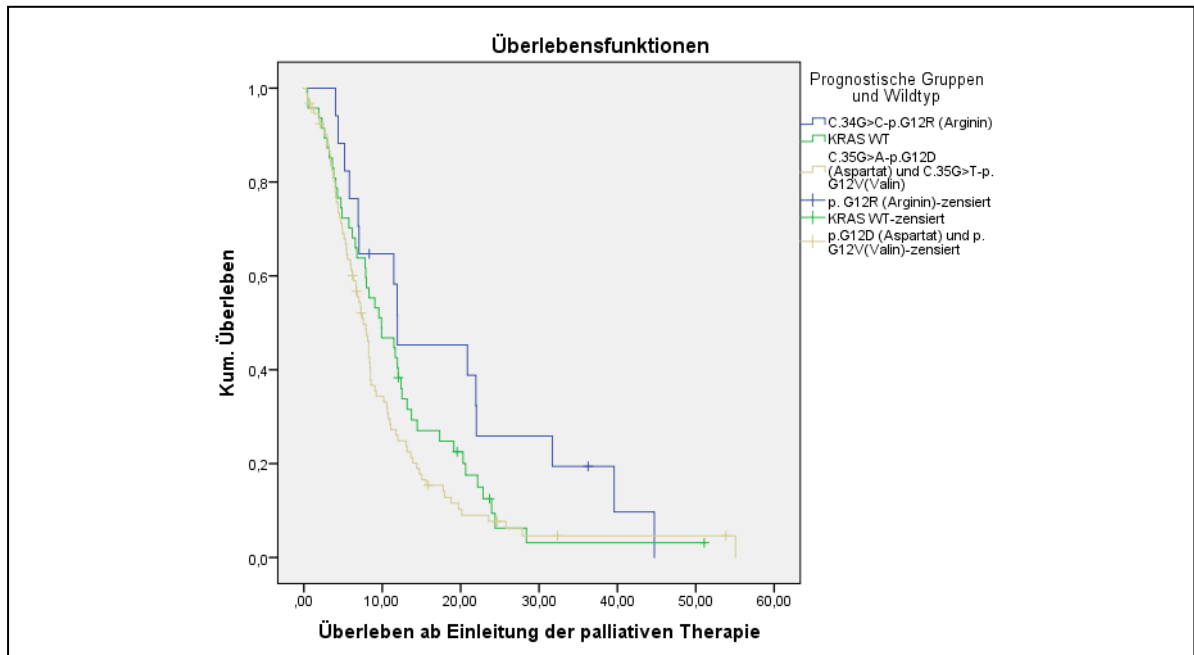


Abb. 37: Kaplan-Meier-Kurve: Korrelation Wildtyp oder prognostische Gruppen mit Überleben

Kurve blau: C.34G>C-p.G12R, Kurve grün: KRAS WT,
Kurve grau: C.35G>A-p.G12D und C.35G>T-p.G12V;

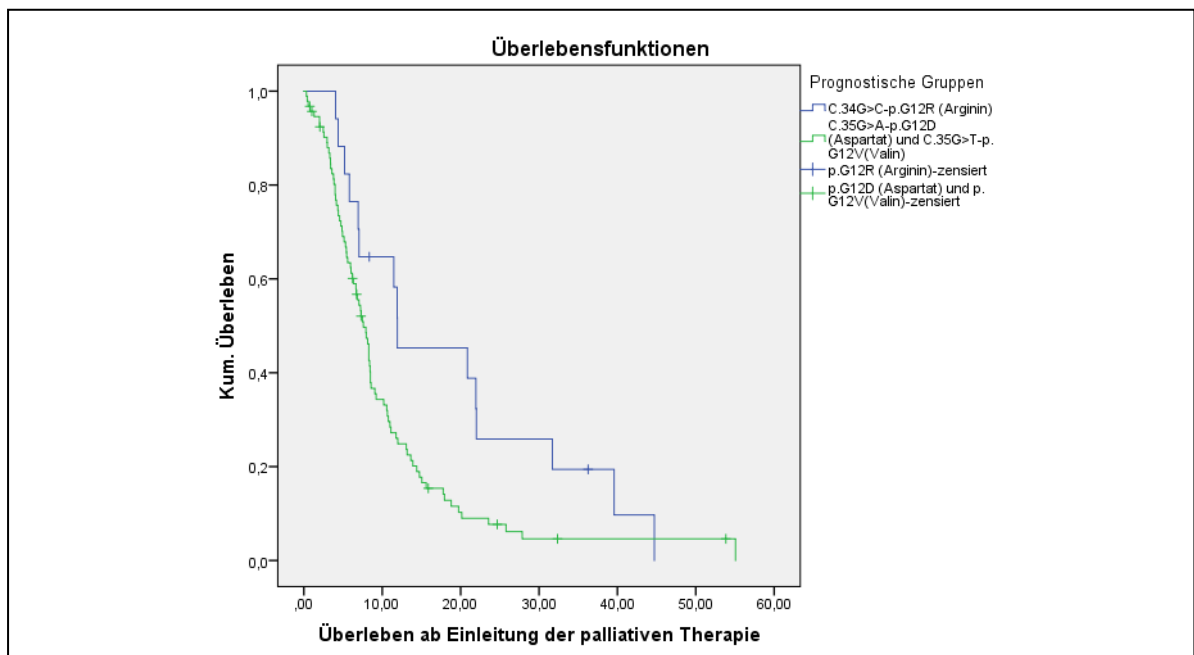


Abb. 38: Kaplan-Meier-Kurve: Korrelation prognostische Gruppen mit Überleben

Kurve blau: C.34G>C-p.G12R, Kurve grün: C.35G>A-p.G12D und C.35G>T-p.G12V;

3.2.3. Mutation in Exon 3

Des Weiteren wurde auch in Exon 3 der Status Wildtyp mit dem Status Mutation hinsichtlich einer Korrelation mit dem Gesamtüberleben der Patienten mittels der Log Rank-Vergleichsanalyse ermittelt. Hier konnte ein Überlebensvorteil für Patienten mit Pankreastumoren, welche einen Status Wildtyp aufzeigen, ermittelt werden. Der Unterschied war deutlich, dennoch aber ohne statistische Signifikanz. Der p-Wert lag bei 0,558. Die zugehörigen statistischen Daten sind der folgenden Tabelle (► Tab. 30), die Überlebenskurve der sich anschließenden Abbildung zu entnehmen (► Abb. 39).

<i>Exon 3</i>	OS in Monaten (Median)	HR (95% CI)	P-Wert (log-Rank)
Wildtyp	8,4	0,766 (0,31 – 1,87)	0,558
Mutation	4,1		

Tab. 30: Statistische Daten Status Exon 3

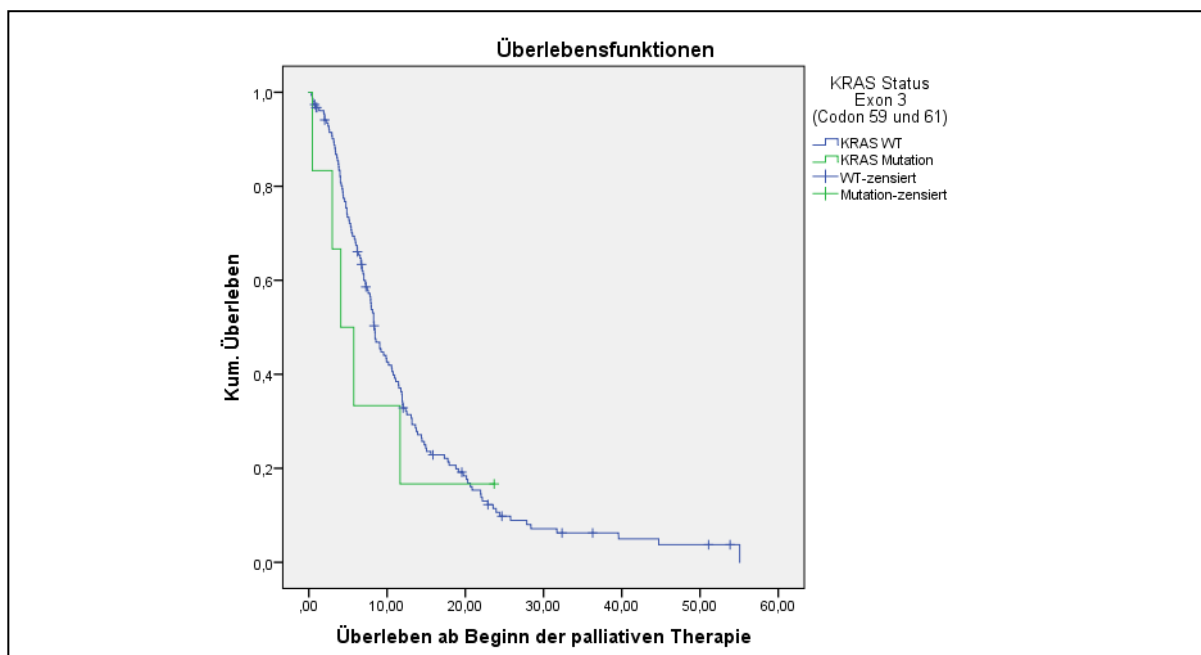


Abb. 39: Kaplan-Meier-Kurve: Korrelation Wildtyp oder Mutation in Exon 3 mit Überleben
Kurve blau: KRAS WT, Kurve grün: KRAS Mutation Exon 3;

3.2.4. Mutation in Exon 2 und 3

Zusätzlich wurde die Überlebenskurve für den Status Mutation, sei diese im Exon 2 oder 3, im Vergleich mit einem Status Wildtyp ermittelt. Auch hier ergab sich kein statistisch signifikanter Überlebensvorteil für eine Gruppe. Der p-Wert lag hier bei 0,572 (► Tab. 31).

Exon 2 + 3	OS in Monaten (Median)	HR (95% CI)	P-Wert (log-Rank)
Wildtyp	9,9	1,12 (0,755 – 1,663)	0,572
Mutation	8,3		

Tab. 31: Statistische Daten Exon 2 und 3

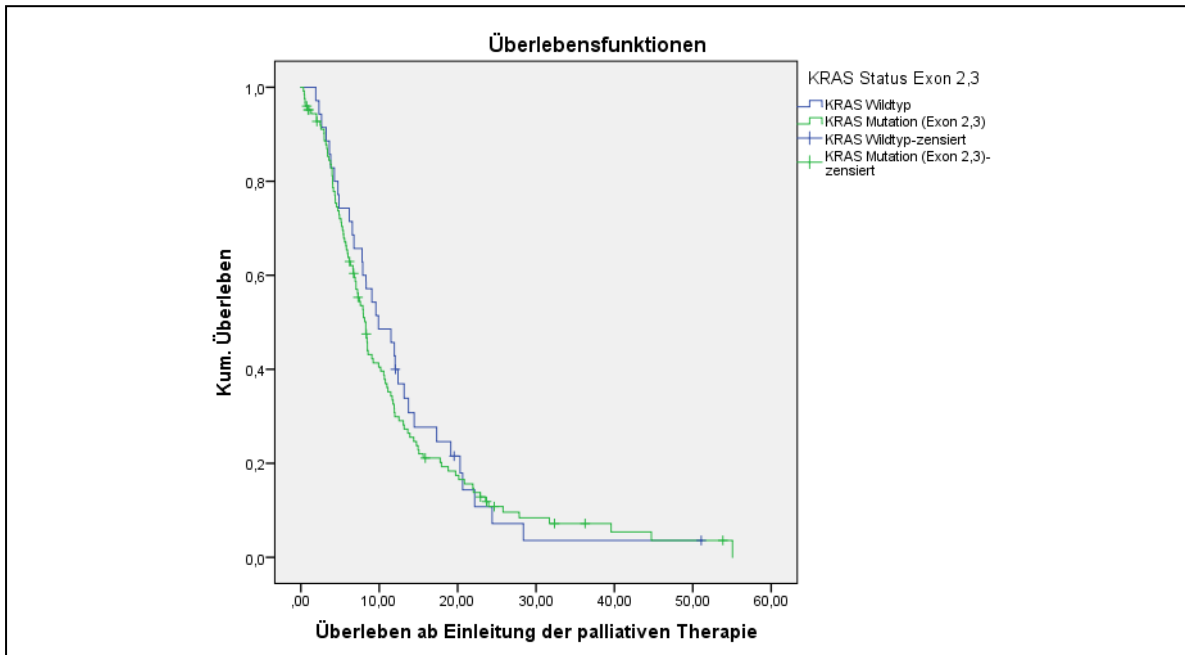


Abb. 40: Kaplan-Meier-Kurve: Korrelation Wildtyp oder Mutation in Exon 2 und 3 mit dem Überleben
Kurve blau: KRAS WT, Kurve grün: Mutation Exon 2,3;

3.2.5. Mutation Exon 2 oder 3

Des Weiteren erfolgte ein Vergleich hinsichtlich des Überlebens zwischen dem Vorliegen einer Mutation im Exon 2 und einer Mutation im Exon 3 des KRAS-Gens. Bei geringen Fallzahlen im Fall einer Mutation im Exon 3 erlangte das Ergebnis keine statistische Signifikanz (p-Wert = 0,599), allerdings zeichnete sich ein deutlicher Überlebensvorteil ab für Patienten mit einer Mutation im Exon 2 gegenüber denen mit einer Mutation im Exon 3. Letztere wiesen eine knapp halb so lange Überlebensdauer auf.

Exon 2/ Exon 3	OS in Monaten (Median)	HR (95% CI)	P-Wert (log-Rank)
Exon 2	8,3	0,79 (0,32 – 1,93)	0,599
Exon 3	4,1		

Tab. 32: Statistische Daten Exon 2 oder Exon 3

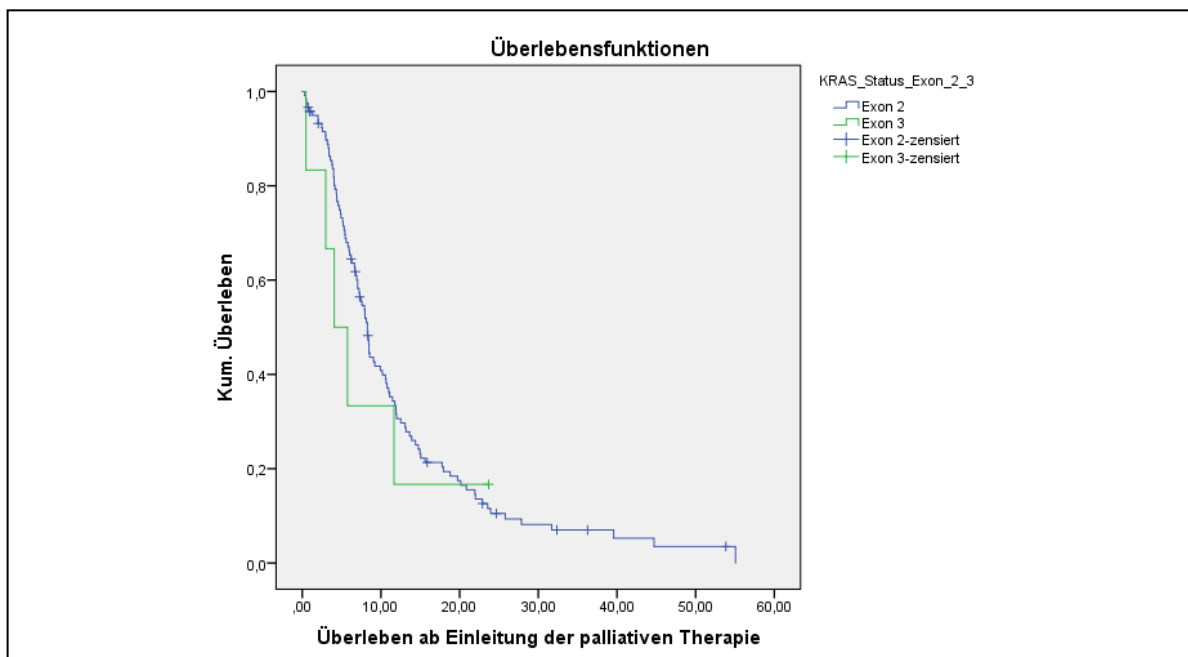


Abb. 41: Kaplan-Meier-Kurve: Korrelation Mutation in Exon 2 oder 3 mit dem Überleben
Kurve blau: Exon 2, Kurve grün Exon 3;

4. Korrelation KRAS-Mutationsstatus mit klinischen Parametern

4.1. KRAS-Mutationsstatus und Karnofsky Performance-Status

Karnofsky-Status	60 – 80 %	prozentual (%)	90 – 100 %	prozentual (%)	Gesamtzahl (n)
Wildtyp	10	16,1	21	24,4	31
Mutation	52	83,9	65	75,6	117
Gesamtzahl (n)	62		86		148

Chi-Quadrat nach Pearson

p-Wert	0,221
---------------	-------

Tab. 33: Keuztabelle: Korrelation KRAS-Mutationsstatus und Karnofsky Performance-Status

Die Korrelations-Analyse zwischen KRAS-Mutationsstatus und dem Karnofsky-Index der Tumorpatienten zeigte auf, dass Patienten mit einem niedrigeren KPS tendenziell prozentual häufiger Mutationen im KRAS-Gen aufweisen. Dabei zeigten die Pankreastumore zu 83,9% (n = 52) Mutationen im KRAS-Genabschnitt, wenn die Tumorkranken einen niedrigeren KPS von 60 – 80% aufwiesen. Bei einem besseren Allgemeinzustand der Patienten und damit einem KPS von 90 – 100% fanden sich nur zu 75,6% (n = 65) Punktmutationen im KRAS-Gen der Pankreastumorzellen. Die Auswertungen hierzu zeigen einen deutlichen

Trend, erreichen jedoch keine statistische Signifikanz bei einem p-Wert von 0,221. Die oben stehende Tabelle veranschaulicht die statistischen Daten zu diesem Ergebnis (► Tab. 33).

4.2. KRAS-Mutationsstatus und Tumorstadium

<i>Tumorstadium</i>	lokal fort- geschritten	prozentual (%)	metasta- siert	prozentual (%)	Gesamtzahl (n)
Wildtyp	5	33,3	30	20,7	35
Mutation	10	66,7	115	79,3	125
Gesamtzahl (n)	15		145		160

Chi-Quadrat nach Pearson

p-Wert	0,259
--------	-------

Tab. 34: Keuztabelle: Korrelation KRAS-Mutationsstatus und Tumorstadium

Bei Vergleich der Patienten mit einem Status Wildtyp mit denjenigen mit einem Status Mutation im Tumorgewebe, zeigte sich keine Möglichkeit der eindeutigen Zuordnung zu den Gruppen ‚lokal fortgeschrittener‘ oder ‚metastasierter‘ Tumor. Dennoch wiesen Tumore mit Fernmetastasen zu 79,3% (n = 115) häufiger Mutationen in der KRAS-Gensequenz auf. Nach Auswertung des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson betrug der p-Wert 0,259, wodurch hinsichtlich des Tumorstadiums kein statistisch signifikanter Einfluss auf die Mutationsrate aufgezeigt werden konnte.

4.3. KRAS-Mutationsstatus und Alter

<i>Alter</i>	≤ 63	prozentual (%)	≥ 64	prozentual (%)	Gesamtzahl (n)
Wildtyp	14	40	21	60	35
Mutation	73	58,4	52	41,6	125
Gesamtzahl (n)	87		73		160

Chi-Quadrat nach Pearson

p-Wert	0,053
--------	-------

Tab. 35: Keuztabelle: Korrelation KRAS-Mutationsstatus und Alter

Bei Betrachtung des Alters der Erkrankten hinsichtlich eines medianen Erkrankungsalters von 63 Jahren fanden sich mehr jüngere Patienten, hier speziell Erkrankte mit einem Alter von weniger als 63 Jahren, welche im Tumorgewebe zugleich auch mit einer höheren Frequenz den Mutationsträgern zugeordnet waren (58,4%, n = 73 vs. 41,6%, n = 52). Umgekehrt zeigten Patienten mit einem Alter über 63 Jahre häufiger einen Status Wildtyp im Karzinomgewebe. Dieser beobachtete Trend erreichte im Qui-Quadrat-Test nach Pearson bei einem p-Wert von 0,053 knapp keine statistische Signifikanz.

4.4. KRAS-Mutationsstatus und CA 19-9 im Serum

CA19-9 i. S.	≤ 586 U/ml	prozentual (%)	> 586 U/ml	prozentual (%)	Gesamtzahl (n)
Wildtyp	22	73,3	8	26,7	30
Mutation	46	43,3	60	56,7	106
Gesamtzahl (n)	68		68		136

Chi-Quadrat nach Pearson

p-Wert	0,004
--------	-------

Tab. 36: Keuztabelle: Korrelation KRAS-Mutationsstatus und CA19-9 im Serum

Des Weiteren zeichnete sich bei Beurteilung des CA 19-9-Wertes im Serum in Bezug auf den medianen Wert von 586 U/ml, ein statistisch signifikanter Einfluss auf die Mutationsrate ab. Der p-Wert lag nach Auswertung des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson bei 0,004. Die größere Anzahl der Erkrankten, welche Tumoren mit einer Mutation im Exon 2 oder 3 aufwiesen, waren mit einem prozentualen Anteil von 56,7% (n = 60) der Gruppe mit den höheren CA 19-9-Werten zugehörig. Bei einem Wildtyp-Status lagen die CA 19-9-Werte zu 73,3% (n = 22) und dementsprechend häufiger unter einem Level von 586 U/ml.

Diskussion

1. Stellenwert des KRAS-Mutationsstatus bei anderen Tumorentitäten

Unter allen bekannten Onkogenen menschlicher Tumoren kommen aktivierende Punktmutationen am häufigsten im KRAS-Gen vor [63, 64]. Dabei treten sie mit der höchsten Frequenz beim Pankreaskarzinom (PC) auf, gefolgt vom kolorektalen Karzinom (CRC) und dem nicht kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC) [5, 29, 31, 35, 65]. Auf Grund des im Allgemeinen dominanten Auftretens von Punktmutationen im KRAS-Gen, scheint der mögliche Einfluss auf die medikamentöse Therapie sowie die dementsprechend klinische Bedeutung klar ersichtlich zu sein.

Bei Tumorentitäten wie dem kolorektalen Karzinom [61, 64, 66, 67] oder dem nicht kleinzelligen Lungenkarzinom [68, 69], konnte mit der Identifikation des KRAS-Mutationsstatus bereits ein wichtiger Marker für das klinische Ansprechen einer spezifischen Anti-EGFR-Therapie in den klinischen Alltag integriert werden. Dabei gilt eine Mutation im Exon 2 des KRAS-Gens bei beiden Tumorentitäten als ein etablierter, prädiktiver Faktor für das fehlende oder verminderte Ansprechen einer Anti-EGFR-Therapie. Im Umkehrschluss profitieren hier Patienten mit einem Wildtyp-Tumor von einer Therapie mit Thyrosinkinase-Inhibitoren wie Cetuximab oder Panitumumab beim CRC [61, 64, 66, 67] oder Erlotinib beziehungsweise Gefitinib beim NSCLC.

Beim kolorektalen Karzinom treten die Punktmutationen am häufigsten im Codon 12 oder seltener im Codon 13 des Exon 2 auf [35, 61, 62, 64, 67]. Zusätzlich scheinen hier die einzelnen Punktmutation-Subtypen einen unterschiedlichen Verlauf hinsichtlich des Überlebens aufzuweisen [35, 70]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass neben den zu 85% im Codon 12 des Exon 2 auftretenden Mutationen [61], auch die mit bis zu 18% im Vergleich dazu selteneren Punktmutationen im Exon 3 und 4 [35] einen relevanten, prädiktiven Einfluss auf die medikamentöse Therapie mit monoklonalen Antikörpern haben [64, 67, 69, 71].

Ähnliche Daten liefern die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit zum Pankreaskarzinom. Auch hier fanden sich die Punktmutationen am häufigsten im Codon 12 des Exon 2. Zusätzlich lagen auch hier vereinzelt Mutationen des Genabschnitts Exon 3 im Falle eines Wildtyp-Status im Exon 2 vor, was wiederum möglicherweise eine Parallele zwischen der Tumorbilogie des Kolorektalen Karzinoms und dem Pankreaskarzinoms darstellt. Hinzu kommt, dass auch die hier vorliegenden Ergebnisse einen unterschiedlichen Verlauf der Mutations-Subtypen hinsichtlich des Überlebens zeigten.

2. Die Rolle des KRAS-Mutationsstatus beim fortgeschrittenen Pankreaskarzinom

2.1. Häufigkeit des Auftretens von Mutationen im KRAS-Gen

Bis zum jetzigen Zeitpunkt konnte die Rolle des KRAS-Mutationsstatus beim fortgeschrittenen Pankreaskarzinom hinsichtlich seiner rein prognostischen, aber auch möglicherweise prädiktiven Bedeutung nicht eindeutig geklärt werden.

Die Analysen der hier vorliegenden Arbeit belegen Mutationen im KRAS-Gen mit einer Häufigkeit von 74%, wobei das Ergebnis, verglichen mit dem anderer Auswertungen, entsprechend im erwarteten Bereich liegt. Verschiedene aktuelle Studien der letzten Jahre zeigten ein prozentuales Vorkommen von Punktmutationen im KRAS-Gen von zwischen 41 und 95% [7, 11, 17, 29, 30, 32, 34, 49, 63, 72-74]. Bisweilen differierten die jeweiligen Patientenpopulationen jedoch hinsichtlich ihrer ethnischen Herkunft sowie der untersuchten Genabschnitte (► Tab. 37).

Author	Herkunft	KRAS-Mutationen (%)	Genabschnitte
Palliative Erstlinien-Therapie im Vergleich mit und ohne Erlotinib-Kombination			
Kim et al. 2011	Korea	52,2	Exon 2, Exon 3
Palliative Erstlinien-Therapie ohne Erlotinib-Kombination			
Wang et al. 2015	China	94,3	Exon 2, Exon 3
Boeck et al. 2013	Europa	70	Exon 2
Da Cunha Santos et al. 2010	Canada	78,6	Exon 2
Palliative Erstlinien-Therapie ohne Erlotinib-Kombination			
Bournet et al. 2016	Europa	67	Exon 2
Ogura et al. 2012	Japan	88,4	Exon 2, Exon 3
Lee et al. 2007	Korea	49	Exon 2, Exon 3
Keine Information zur Therapie			
Kwon et al. 2015	Korea	47,2	Exon 2
Sinn et al. 2014	Europa	68	Exon 2
Shin et al. 2013	Korea	53,8	Exon 2
Olivera-Cunha et al. 2012	Europa	41,2	Exon 2, Exon 3
Kawesah et al. 2000	Europa	75	Exon 2

Tab. 37: Prozentuale Häufigkeiten von KRAS-Mutationen in aktuellen Studien

Hinsichtlich der Vielzahl an unterschiedlichen medikamentösen und chirurgischen Behandlungsoptionen der Pankreastumoren weisen die verschiedenen Studien teilweise

sehr unselektierte Patientenkollektive auf. Dies könnte einen möglichen Grund für das weit gestreute Häufigkeitsspektrum der Mutationen im KRAS Gen darstellen. Die Punktmutationen treten insgesamt in hoher Frequenz auf, der gefundene prozentuale Anteil scheint in den jeweiligen Studien zum Teil dennoch relativ unterschiedlich zu sein. Zudem könnten auch spezifische Patientencharakteristika, wie beispielsweise der ethnische Ursprung der Karzinompatienten, Einfluss nehmen. Dabei werden zum Beispiel in der koreanischen Bevölkerung tendenziell weniger KRAS-Mutationen nachgewiesen als bei Europäern, Amerikanern oder auch in der übrigen asiatischen Bevölkerung [29, 75]. Dies zeigen beispielsweise – im Vergleich zu Studien mit Patienten überwiegend kaukasischer Herkunft – die Angaben von Lee, Kwon und Kim und Mitarbeiter, deren Patientenkohorten koreanischen Ursprunges sind (► Tab. 37). Zusätzlich werden die Mutationen auf Grund des Fehlens verschiedener Einflussfaktoren und einem damit fehlenden Selektionsdruck zu bestimmten Zeitpunkten der Karzinogenese (noch) nicht nachgewiesen. Beispiele hierfür wären der Raucher-Status der Patienten [35] oder auch das Vorliegen von Grunderkrankungen wie einem Diabetes mellitus [29, 64, 74], welche mittlerweile als bekannte Risikofaktoren für die Entstehung eines Pankreaskarzinoms gelten.

2.2. Analysierte Gensequenzen: Exon 2, 3 und 4 sowie Subtypisierung

Im Rahmen der meisten Studien, die sich mit der Analyse von KRAS-Genmutationen beschäftigten, wurde zumeist lediglich das Exon 2 des Gens mit Codon 12 und 13 untersucht [7, 11, 32, 34, 65, 70]. Teilweise wurden auch Untersuchungen des Exon 3 mit Codon 61 durchgeführt [7, 30, 63], das Exon 4 wurde bis zum jetzigen Zeitpunkt, die hier vorliegende Arbeit ausgenommen, nicht analysiert.

Im Allgemeinen tritt beim Pankreaskarzinom die weit größte Anzahl der Mutationen im Codon 12 der Gensequenz Exon 2 auf [35, 64, 70]. Der mehrheitlich auftretende Punktmutations-Subtyp stellt hier G12D dar [7, 76]. Auch unter den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit war diese Mutation mit 36,3% am häufigsten zu finden.

Hinsichtlich des Überlebens wurden in den aktuellen Studien zu KRAS/ Exon 2 bislang nur selten Subtypisierungen der einzelnen Punktmutationen sowie eine Differenzierung hinsichtlich des Langzeitüberlebens vorgenommen [7, 65, 70, 76]. Hierbei konnten Ogura und Mitarbeiter unter den einzelnen Mutations-Subtypen im Codon 12 des KRAS-Gens, einen signifikanten Unterschied im Gesamtüberleben feststellen. Patienten mit der Punktmutation G12V zeigten dabei ein besseres Outcome. Beim Vorliegen der übrigen häufigen Mutationen (G12D und G12R) bestand jedoch keine signifikant längere Überlebensdauer für die Erkrankten [7]. Ähnliche Ergebnisse lieferten Kawesha und Mitarbeiter. Auch hier zeigten die Subtypen signifikant differierende Daten im Gesamtüberleben, wobei hier

ebenfalls die Mutation G12V eine prognostisch günstige Variante darstellte [70]. Die Ergebnisse einer weiteren Arbeitsgruppe um Immervoll zeigten ebenfalls einen Trend im Sinne von unterschiedlichen Überlebensdaten der Pankreaskarzinom-Patienten hinsichtlich der verschiedenen Subtypen, jedoch ohne statistische Signifikanz [65]. Die Analysen im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit schlossen ebenso eine genaue Analysierung der drei am häufigsten vorkommenden Punktmutationen im Exon 2 des KRAS-Gens (G12D, G12V und G12R) mit ein. Auch hier fand sich ein deutlich variabler Verlauf des Überlebens untereinander. Im Gegensatz zu den Daten der oben genannten Studien (Ogura und Kawesha) konnte aufgezeigt werden, dass der Nachweis der Punktmutation G12R im Vergleich zu einem Vorliegen der beiden anderen Mutationen mit einem statistisch signifikant längeren Überleben vergesellschaftet ist. Erstaunlicher Weise fand sich hierbei sogar ein Überlebensvorteil gegenüber dem Wildtyp. Zu diesen hier gewonnenen Daten vergleichbare Ergebnisse konnte eine Arbeitsgruppe aus Frankreich liefern. Bournet und Mitarbeiter stellten den Punktmutationssubtyp G12D als einen prognostisch ungünstigen Biomarker dar. Mit nächst kürzerer Überlebensdauer folgte die Mutation G12V. Die beste Prognose fand sich, wie auch in der hier vorliegenden Arbeit, beim Vorliegen der Mutation G12R. Diese Ergebnisse erlangten, ebenso wie die hier vorliegenden Daten, statistische Signifikanz.

Die aktuelle Studienlage spricht somit dafür, dass Pankreaskarzinome durch die Existenz von bestimmten Mutationen möglicherweise eine veränderte Tumorbilogie aufweisen, wodurch das Überleben der betroffenen Patienten maßgeblich beeinflusst werden kann. Auf Grund der derzeit noch bestehenden Diskrepanz zwischen den einzelnen Studienergebnissen, scheinen möglicherweise zusätzliche Faktoren relevant zu sein, welche in Kombination mit den einzelnen Punktmutations-Subtypen Auswirkungen auf die Prognose haben. Der Status einer Mutation im KRAS-Gen würde daher nicht als ein alleinig prognostischer Faktor wirken.

Vereinzelt haben Studienprofile auch die Gensequenz des Exons 3 (Codon 61) mit einbezogen [29, 30]. Mutationen innerhalb dieses Genabschnittes fanden dabei in nur geringer Anzahl. Hierzu korrelieren die Ergebnisse der hier vorliegenden Datenauswertung. Im Hinblick der geringen Anzahl an gefundenen Punktmutationen in dieser Gensequenz, scheinen Mutationen im Exon 3 des kKRAS-Gens beim Pankreaskarzinom einen eher geringeren Stellenwert einzunehmen. Allerdings ließ sich bei den Überlebensanalysen des Mutationsstatus im Exon 3 ein deutlicher positiver prognostischer Wert abzeichnen, wenn im Karzinomgewebe ein Wildtyp nachgewiesen wurde. Zusätzlich ließ sich der Trend eines Überlebensnachteils der Exon 3-Mutationen im Vergleich zum Auftreten einer Mutation im Exon 2 darstellen. Diese Überlebensdifferenz erscheint auf den ersten Blick und in Anbetracht der geringen Fallzahl an Exon 3-Mutationen wenig Aussagekraft zu besitzen,

jedoch könnte sich diese Beobachtung in zukünftigen Studien bei einer größerer Kohortenzahl bestätigen lassen. Dies würde demnach bedeuten, dass eine Mutation im Exon 3, verglichen mit jener im Exon 2, mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet ist. Zudem wiesen die in Exon 3 mutierten Karzinomgewebe niemals zeitgleich auch eine Mutation im Exon 2 auf, was wiederum eine Mutation im Exon 3 als eine unabhängige eventuell auch prognostische Variable darstellt.

Im Gegensatz dazu spiegeln die Analysen zum Exon 4 des KRAS-Gens und das hier fehlende Vorkommen von Punktmutationen im Rahmen der hier vorliegenden Ergebnisse mutmaßlich die geringe Relevanz beim PDAC wider. Hierzu sind bis dato ebenso keine Untersuchungen durch fremde Studien bekannt.

2.3. Prognostischer Stellenwert

Die meisten Studien zum Pankreaskarzinom haben KRAS-Mutationen im Tumorgewebe als einen prognostischen Faktor dargestellt. Die Ergebnisse veranschaulichten jeweils, dass eine Punktmutation im KRAS-Gen, verglichen mit einem Status Wildtyp im entsprechenden Genabschnitt, mit einer schlechteren Prognose verbunden ist [7, 11, 33, 34, 77]. Sinn und Mitarbeiter beispielsweise zeigten an einem Kollektiv von 153 resezierten Pankreaskarzinom-Patienten einen signifikanten Unterschied im Überleben auf (12,7 vs. 20,7 Monate; $p = 0,03$). Hierbei wurde an operativ gewonnenen Pankreaskarzinom-Geweben eine Mutationsanalyse im KRAS-Gen, Exon 2 und 3 durchgeführt, wobei allerdings keine Angaben zu einer zusätzlich erfolgten neoadjuvanten Chemotherapie geliefert wurden, welche möglicherweise auch Erlotinib enthielt.

Im Gegensatz dazu fand sich bei der Auswertung der hier vorliegenden Ergebnisse keine Korrelation zwischen einer KRAS-Mutation im Exon 2 oder 3 und dem Überleben. Bei Patienten unter Behandlung mit einer palliativen Chemotherapie ohne Einbeziehung von Erlotinib, zeigte das Vorliegen eines Wildtyps im KRAS-Gen kein längeres Überleben. Diese Tatsache lässt vermuten, dass der KRAS-Mutationsstatus nur dann eine prädiktive Aussagekraft hat, wenn eine Anti-EGFR-Therapie durchgeführt wird.

Die hier gewonnenen Ergebnisse korrelieren mit denen der Forschungsgruppe um Bournet. Hier konnte bei 162 Patienten, welche ebenfalls mit einer palliativen Chemotherapie ohne Zugabe von Erlotinib behandelt wurden, ebenfalls kein Unterschied im Überleben, nachgewiesen werden (10,0 Monate vs. 9,5 Monate; HR 1,02; $p = 0,088$) [17].

Ähnliche Daten und damit keine Assoziation zwischen dem KRAS-Mutationsstatus und dem Überleben lieferten zudem auch wenige andere Arbeitsgruppen [29, 49, 70, 73]. In der Zusammenschau lassen die erläuterten Daten eine prädiktive Relevanz des KRAS-Status für eine Erlotinib-Therapie vermuten.

2.4. Prädiktive Bedeutung für Erlotinib

Die Annahme eines prädiktiven Wertes des KRAS-Status für eine Erlotinib-Therapie unterstützen die Ergebnisse der Studie von Kim und Mitarbeitern. Hier wurden 2011 zwei sich in der Therapie unterscheidende Patienten-Gruppen (Gesamtkollektiv $n = 136$) hinsichtlich des mit dem Überleben korrelierenden Mutationsstatus im KRAS-Gen, verglichen. Ähnlich der hier vorliegenden Voraussetzungen wurde ein Teil der Patienten mit Gemcitabine plus Erlotinib therapiert, der andere Teil ohne die Kombination einer Anti-EGFR-Therapie. Der beobachtete Überlebensvorteil war hierbei abhängig von der Therapie. In der Gruppe, die mit Erlotinib therapiert wurde, zeigte sich ein längeres Überleben der Patienten mit einem Status Wildtyp (WT 9,7 vs. Mutation 5,2 Monate; HR 0,453 (0,274 – 0,750); $p = 0,002$). In der anderen Gruppe ohne Erlotinib-Behandlung zeichnete sich in diesem Fall kein Vorteil im Überleben ab (WT 7,0 vs. Mutation 7,0 Monate; HR 0,676 (0,407 – 1,122); $p = 0,121$) [29].

Gemeinsam mit den in Kapitel 2.3. erläuterten Beobachtungen zeigt sich also, dass der KRAS-Status alleine keinen Einfluss auf die Überlebensdauer hat, wenn Patienten eine Anti-EGFR-freie Therapie erhalten. Hieraus könnte daher geschlussfolgert werden, dass der KRAS-Status Wildtyp einen prädiktiven Faktor für das erfolgreiche Ansprechen einer Erlotinib-Therapie darstellt. Dies bestätigt sich zusätzlich in Zusammenschau mit den Ergebnissen der translationalen Crossover-Studie AIOPK0104 von Boeck, Heinemann und Mitarbeitern im Jahr 2013, welche im Vorfeld der hier vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde. Hier erfolgte unter anderem ebenfalls die Analyse des KRAS-Mutationsstatus im Exon 2 aus Geweben von fortgeschrittenen Pankreaskarzinomen. Das Kollektiv ($n = 173$) erfasste hierbei Patienten, die Erlotinib im Rahmen der palliativen medikamentösen Behandlung erhielten. Hierbei konnte ein statistisch signifikanter Überlebensvorteil (WT 7,9 vs. Mutation 5,7 Monate; HR 1,68 (1,17 – 2,41; $p = 0,005$) für den Status Wildtyp KRAS-Gen aufgezeigt werden [32].

Gemeinsam mit den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit, die nun an einem Kollektiv ohne Erlotinib-Behandlung erfasst wurden, ist es demnach also möglich zwischen der rein prognostischen oder aber auch prädiktiven Bedeutung des KRAS-Status für Erlotinib zu differenzieren. Beide Studien analysierten das Exon 2 des KRAS-Gens, die Kollektive enthielten eine vergleichbare Fallzahl ($n = 173$ in der Crossover-Studie, $n = 160$ vorliegenden Arbeit). In Zusammenschau der Ergebnisse dieser beiden retrospektiven Studien konnte schließlich der prädiktive Stellenwert des KRAS-Status für Erlotinib unterstützt werden. Bei Vorliegen eines Wildtyps im Exon 2 des KRAS-Gens kann bei Behandlung mit dem dem EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitor Erlotinib ein längeres Gesamtüberleben erreicht werden als bei Patienten mit KRAS-mutierten Tumoren.

3. Prognostische Rolle weiterer klinischer sowie tumorspezifischer Parameter und Einfluss auf die Tumorbilogie

In Übereinstimmung zu den Ergebnissen einiger anderer Studien zeigten auch die hier vorliegenden Analysen auf, dass ein reduzierter Allgemeinzustand mit einem dementsprechend erniedrigten Karnofsky Performance-Status von 60 – 80%, als ein prognostisch ungünstigen Faktor gewertet werden kann. Die ermittelten Ergebnisse erlangten dabei zusätzlich statistische Signifikanz. Zudem war das Überleben im Falle einer Fernmetastasierung im Vergleich zum Status eines lokal fortgeschrittenen Tumors verkürzt. Insbesondere eine Beteiligung der Leber im Rahmen der Metastasierung wirkte sich hier negativ auf das Gesamtüberleben der Tumorpatienten aus. Bei Vorliegen einer zehrenden Tumorerkrankung erscheinen diese Beobachtungen nur konsequent. Dementsprechend wäre wohl zusätzlich davon auszugehen, dass Patienten mit einem höheren Lebensalter auf Grund von möglichen Zweiterkrankungen und/ oder physiologischen Alterserscheinungen ebenfalls stärker beeinträchtigt werden. Interessanterweise erbrachten die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung einen Überlebensvorteil für Patienten mit einem Alter von 64 Jahren oder älter. Zusätzlich fanden sich in dieser Altersgruppe auch weniger häufig Mutationen im KRAS-Gen als in der Patientengruppe mit einem Alter unterhalb des Medianwertes von 63 Jahren. Hinzu kommt, dass die Tumorgewebe bei Patienten mit einem niedrigeren KPS ebenfalls mit einer höheren Frequenz Mutationen im KRAS-Gen aufwiesen. Außerdem waren die Tumore mit höherer Wahrscheinlichkeit metastasiert, falls eine Mutation vorlag. Interessanterweise konnte zudem beobachtet werden, dass die Patientengruppe mit einem CA19-9-Wert oberhalb des medianen Levels von 586 U/ml auch eine höhere Rate an KRAS-Mutationen zeigte. Diese Beobachtungen spiegeln die mögliche Assoziation zwischen Mutationen im KRAS-Gen und der Tumorbilogie des Pankreaskarzinoms wider. Die dargestellten Ergebnisse zeigen auf, dass mutierte Tumore ein weit aggressiveres biologisches Verhalten zeigen, was letztlich zu einem kürzeren Überleben beiträgt. Jüngere Personen scheinen dabei initial häufiger von aggressiveren Tumorvarianten mit hohen Mutationsraten betroffen zu sein.

Die Assoziation zwischen hohen CA19-9-Werten im Serum und im KRAS-Gen mutierten Tumoren erbrachte in der hier vorliegenden Arbeit statistische Signifikanz. Auch Ogura und Mitarbeiter konnten eine gesteigerte Mutationsrate bei einem hohem CA19-9 aufzeigen, wenn auch ohne statistische Signifikanz. Allerdings sind diese Ergebnisse kontrovers zu denen von Bournet und Mitwirkenden, die keine Korrelation erkennen konnten, wobei hier ein niedriger Cut-off-Wert herangezogen wurde. Im Falle einer tatsächlichen Korrelation zwischen einem Status Mutation und dem CA19-9-Level wäre dies sicherlich eine wichtige Erkenntnis für die klinische Tumordiagnostik. Künftig könnte der CA19-9-Wert im Serum

möglicherweise als Parameter für die Indikation zur Genmutationsanalyse Verwendung finden.

4. Limitationen der vorliegenden Untersuchung

In den letzten Jahren wurden einige Arbeiten zur Rolle des KRAS-Mutationsstatus beim fortgeschrittenen Pankreaskarzinom veröffentlicht. Die analysierten Daten hierzu waren jedoch – wie in den vorhergehenden Abschnitten beschrieben – relativ uneinheitlich. Im Rahmen der meisten Studien erfolgten die Analysen des KRAS-Mutationsstatus an einem sehr vielfältig zusammengesetzten Patientenkollektiv. In den meisten Fällen wurde keine Differenzierung zwischen den therapeutischen Behandlungsmaßnahmen vorgenommen, beziehungsweise keine Angaben zu einer möglicherweise durchgeführten, neoadjuvanten Behandlung im Falle einer chirurgischen Therapie, zur angewandten, palliativen Chemotherapie oder auch zu zusätzlichen Therapieoptionen wie einer kombinierten Anti-EGFR-Therapie, gemacht [11, 34]. So gab es innerhalb eines Kollektivs einerseits einen Teil Karzinomkranker mit Behandlung durch EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitoren wie Erlotinib, andererseits auch einen Teil der Patienten die eine palliative Chemotherapie ohne Erlotinib erhalten haben. Dies führte letztlich zu heterogenen Patientenkollektiven mit nur bedingter Vergleichbarkeit. Die endgültige Einordnung der Rolle des KRAS-Mutationsstatus als prognostischer oder prädiktiver Marker war daher nicht vollends möglich. Neben dieser Therapievariabilität gibt es weitere limitierende Faktoren, welche für nahezu alle translationalen KRAS-Studien zum Pankreaskarzinom gelten [78]. Zum einen waren die meisten Studien retrospektiv durchgeführt worden, zum anderen waren die Patienten-Kohorten auch hinsichtlich ihres Tumorstadiums wenig gut vergleichbar. Beispielsweise kam es zu einer Vermischung resektabler Karzinome mit lokal fortgeschrittenen, aber auch metastasierten Pankreaskarzinomen innerhalb eines Kollektivs. Außerdem schlossen manche Studien auch andere Tumorarten wie das periampulläre Karzinom oder das Adenokarzinom des Duodenums mit ein [73, 78].

5. Die Rolle des NRAS-Mutationsstatus beim fortgeschrittenen Pankreaskarzinom

Parallel wurde am hier vorliegenden Patientenkollektiv der NRAS-Mutationsstatus in den Exonsequenzen 2,3 und 4 untersucht (► Dissertation: NRAS und smad4 als Biomarker bei fortgeschrittenem Pankreaskarzinom; A. Remold). Hier konnte in allen untersuchten Genabschnitten lediglich ein NRAS-Wildtyp nachgewiesen werden. Damit spielt der NRAS-

Mutationsstatus beim PDAC sowohl als prognostischer als auch als prädiktiver Marker keine entscheidende Rolle.

Im Rahmen dieser Dissertation erfolgte zusätzlich die immunhistochemische Untersuchung von SMAD4 als ebenfalls möglicher prognostischer oder prädiktiver Parameter beim fortgeschrittenen Pankreaskarzinom.

Zusammenfassung

Um zwischen der rein prognostischen und der möglicherweise auch prädiktiven Bedeutung des KRAS-Mutationsstatus beim fortgeschrittenen Pankreaskarzinom unterscheiden zu können, erfolgte im Rahmen der hier vorliegende Arbeit die gezielte Zusammenstellung einer Kohorte von 160 Fällen, welche Patienten inkludierte, die eine Erstlinien-Chemotherapie unter Ausschluss einer anti-EGFR-Therapie mit Erlotinib erhalten hatten. In Zusammenschau mit den bereits publizierten Ergebnissen der AIO-PK-0104-Studie (n = 173), welche Patienten mit erfolgter Erlotinib-Therapie untersuchte, konnte nun anhand der Erlotinib-freien Kohorte die prädiktive Bedeutung des KRAS-Mutationsstatus für eine Erlotinib-Therapie nachgewiesen werden.

Bei Vorliegen eines Wildtyps im KRAS-Gen – Exon 2 oder 3 –, kann im Vergleich zu KRAS mutierten Tumoren nur dann eine bessere Prognose erwartet werden, wenn eine anti-EGFR Therapie durchgeführt wird. Umgekehrt ist die KRAS-Mutation in Abwesenheit einer anti-EGFR Therapie und in der Zusammenschau aller Mutationssubtypen nicht mit einer schlechteren Prognose verbunden.

Hinsichtlich der absoluten Häufigkeiten und der Verteilung von Mutationen im KRAS-Gen stimmten die hier erfassten Daten im Vergleich mit den Ergebnissen der publizierten Literatur überein. Die in der vorliegenden Untersuchung festgestellte Häufigkeit von KRAS-Mutationen lag bei 78%. Dabei zeigten sich 74,4% dieser Mutationen im Exon 2, wobei am häufigsten der Subtyp G12D aufgetreten war. Im Exon 3 fanden sich, wie erwartet, mit 3,7% nur selten Mutationen. In keinem Fall kamen gleichzeitig Mutationen in Exon 2 und 3 vor. Punktmutationen im Exon 4 konnten im vorliegenden Kollektiv nicht nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen die Hypothese, dass die verschiedenen Mutationen im KRAS durchaus mit einer unterschiedlichen biologischen Relevanz verbunden sein können. Die verschiedenen Mutations-Subtypen im Exon 2 waren mit durchaus unterschiedlichen Überlebenszeiten assoziiert. So wurde bei Vorliegen der Punktmutation G12R, im Vergleich zu den weit häufiger vorkommenden Mutationen G12D und G12V eine günstigere Prognose festgestellt. Im direkten Vergleich der Überlebenskurven von Mutationen in Exon 2 und 3, zeigte sich bei Vorliegen einer Punktmutation im Exon 3 ein prognostisch ungünstigerer Verlauf, wobei die geringe Anzahl der gefundenen Mutationen im Genabschnitt Exon 3 beachtet werden müssen.

Anhang

1. Abbildungen

Abbildung	Titel
Abb. 1	TNM-Klassifikation Pankreaskarzinom
Abb. 2	Histopathologisches Grading
Abb. 3	Tumorprogressionsmodell Pankreaskarzinom
Abb. 4	Überblick über die Signaltransduktionswege unter Beteiligung von KRAS
Abb. 5	Gesamtkollektiv und Anteil endgültiges Kollektiv
Abb. 6	Tumorareal im Leberbiopsat exemplarisch
Abb. 7 a+b	Vorher-Nachher-Vergleich: Tumorareal mit angrenzendem Normalgewebe
Abb. 8	Beladung und Innenraum QIAcube
Abb. 9	PreRun Information Ausdruck exemplarisch
Abb. 10	Luciferase-Reaktion
Abb. 11	KRAS, Exon 2 (p.12,13): Pyrogramm Wildtyp
Abb. 12	Auftreten von Punktmutationen in KRAS, Exon 2 (p.12,13)
Abb. 13	Pyrogramme der gefundenen Punktmutationen in KRAS, Exon 2 (p.12,13)
Abb. 14	KRAS, Exon 3 (p.59,61): Pyrogramm Wildtyp
Abb. 15	Auftreten von Punktmutationen in KRAS, Exon 3 (p.59,61)
Abb. 16	Pyrogramme der gefundenen Punktmutationen in KRAS, Exon 3 (p.59,61)
Abb. 17	KRAS, Exon 4 (p.117): Pyrogramm Wildtyp
Abb. 18	Auftreten von Punktmutationen in KRAS, Exon 4 (p.117)
Abb. 19	KRAS, Exon 4 (p.146): Pyrogramm Wildtyp
Abb. 20	Auftreten von Punktmutationen in KRAS, Exon 4 (p.146)
Abb. 21	Lokalisation Primarius Pankreaskarzinom

Abbildung	Titel
Abb. 22	Erkrankungsstadium bei Beginn palliative Chemotherapie
Abb. 23	Anzahl betroffener Organe im Fall der Fernmetastasierung
Abb. 24	Lokalisation Fernmetastasen und absolute Anzahl
Abb. 25	Prozentuale Anteile palliative Chemotherapeutika
Abb. 26	Übersicht KRAS-Mutationsstatus in prozentualer Verteilung und absoluter Anzahl
Abb. 27	Säulendiagramm Häufigkeiten der Punktmutationen in Exon 2
Abb. 28	Kaplan-Meier-Kurve: Korrelation Geschlecht mit dem Überleben
Abb. 29	Kaplan-Meier-Kurve: Korrelation Alter mit dem Überleben
Abb. 30	Kaplan-Meier-Kurve: Korrelation KPS mit dem Überleben
Abb. 31	Kaplan-Meier-Kurve: Korrelation CA19-9-Wert mit dem Überleben
Abb. 32	Kaplan-Meier-Kurve: Korrelation Tumorstadium bei Start der palliativen Therapie mit dem Überleben
Abb. 33	Kaplan-Meier-Kurve: Korrelation Metastasenbefall eines oder mehrerer Organe mit dem Überleben
Abb. 34	Kaplan-Meier-Kurve: Korrelation Leber- vs. übrige Metastasierung mit dem Überleben
Abb. 35	Kaplan-Meier-Kurve: Korrelation Wildtyp oder Mutation in Exon 2 mit Überleben
Abb. 36	Kaplan-Meier-Kurve: Korrelation Wildtyp oder jeweilige Punktmutationen in Exon 2 mit Überleben
Abb. 37	Kaplan-Meier-Kurve: Korrelation Wildtyp oder prognostische Gruppen mit Überleben
Abb. 38	Kaplan-Meier-Kurve: Korrelation prognostische Gruppen mit Überleben
Abb. 39	Kaplan-Meier-Kurve: Korrelation Wildtyp oder Mutation in Exon 3 mit Überleben
Abb. 40	Kaplan-Meier-Kurve: Korrelation Wildtyp oder Mutation in Exon 2 und 3 mit Überleben
Abb. 41	Kaplan-Meier-Kurve: Korrelation Mutation in Exon 2 oder 3 mit Überleben

2. Tabellen

Tabelle	Titel
Tab. 1	Herkunft der Patientendaten und Untersuchungsmaterialien
Tab. 2	Übersicht über Verbrauchsmaterialien und Geräte für die Schnittherstellung
Tab. 3	Übersicht über Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Geräte für die DNA-Extraktion
Tab. 4	Pipettierungsschema Mastermix KRAS (Bsp. 30 Ansätze)
Tab. 5	Schema Arbeitszyklus Hyp 50x60-pyr KRAS
Tab. 6	Übersicht über Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Geräte für die Polymerase-Ketten-Reaktion
Tab. 7	Verdünnungsansatz Sepharose-Beads (Bsp. 30 Ansätze)
Tab. 8	Verdünnungsansatz Primer Pyrosequenzierung (Bsp. 30 Ansätze)
Tab. 9	Übersicht über Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Geräte für die Pyrosequenzierung
Tab. 10	Allgemeine Patientencharakteristika
Tab. 11	Tumor-spezifische Patientencharakteristika
Tab. 12	Metastasencharakteristik
Tab. 13	Häufigkeiten Wildtyp/ Mutation in KRAS Exon 2, 3 und/oder 4
Tab. 14	Verteilung Punktmutationen auf die Exons des KRAS-Gens
Tab. 15	Häufigkeiten Wildtyp/Mutation in KRAS Exon 2
Tab. 16	Häufigkeiten der Punktmutationen in Exon 2
Tab. 17	Häufigkeiten Wildtyp/Mutation in KRAS Exon 3
Tab. 18	Häufigkeiten der Punktmutationen in Exon 3
Tab. 19	Statistische Daten Geschlecht
Tab. 20	Statistische Daten Alter
Tab. 21	Statistische Daten KPS
Tab. 22	Statistische Daten CA19-9
Tab. 23	Statistische Daten Tumorstadium bei Start palliativer Chemotherapie

Tabelle	Titel
Tab. 24	Häufigkeiten Metastasenbefall hinsichtlich Anzahl Organe
Tab. 25	Statistische Daten Leberbeteiligung
Tab. 26	Statistische Daten Status Exon 2
Tab. 27	Statistische Daten Punktmutationen in Exon 2
Tab. 28	Statistische Daten Prognostische Gruppen
Tab. 29	Statistische Daten Prognostische Gruppen ohne Wildtyp
Tab. 30	Statistische Daten Status Exon 3
Tab. 31	Statistische Daten Exon 2 und 3
Tab. 32	Statistische Daten Exon 2 oder 3
Tab. 33	Kreuztabelle: Korrelation KRAS-Mutationsstatus und KPS
Tab. 34	Kreuztabelle: Korrelation KRAS-Mutationsstatus und Tumorstadium
Tab. 35	Kreuztabelle: Korrelation KRAS-Mutationsstatus und Alter
Tab. 36	Kreuztabelle: Korrelation KRAS-Mutationsstatus und CA19-9-Level
Tab. 37	Prozentuale Häufigkeiten von KRAS-Mutationen aktueller Studien

3. Eigene Veröffentlichungen und Posterpräsentation

World Journal of Gastroenterologie, 2014:

Translational research in pancreatic ductal adenocarcinoma: current evidence and future concepts [31]

Kruger S 1, Haas M 1, Ormanns S 1, Bächmann S 1, Siveke JT 1, Kirchner T 1, Heinemann V 1, Boeck S 1

1 Stephan Kruger, Michael Haas, Sibylle Bächmann, Volker Heinemann, Stefan Boeck, Department of Internal Medicine III and Comprehensive Cancer Center, Klinikum Grosshadern, Ludwig-Maximilians-University of Munich, D-81377 Munich, Germany.

99. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie (DGP), Frankfurt, 2015

Posterpräsentation:

The role of ras mutations in advanced pancreatic adenocarcinoma: predictive or prognostic significance?

S. Bächmann 1,2, M. Haas 1, A. Remold 1,2, A.M. Schlitter 4, I. Esposito 4, J.T. Siveke 3, A. Jung 2, T. Kirchner 2, V. Heinemann 1, S. Böck 1, S. Ormanns 2

1 Department of Hematology and Oncology, Klinikum Großhadern and Comprehensive Center, Ludwig-Maximilians-University Munich; 2 Institute of Pathology, Ludwig-Maximilians-University Munich; 3 Department of Gastroenterology, Klinikum rechts der Isar, Technical University Munich; 4 Institute of Pathology, Technical University Munich;

www.pankreaszentrum-muenchen.de

BJC, British Journal of Cancer, 2017:

Extended RAS Analysis and Correlation with Overall Survival in Advanced Pancreatic Cancer [79]

Michael Haas 1, Steffen Ormanns 2, Sibylle Baechmann 1,2, Anna Remold 1,2, Stephan Kruger 1, Christoph B. Westphalen 1, Jens T. Siveke 3, Patrick Wenzel 3, Anna Melissa Schlitter 4, Irene Esposito 4, Detlef Quitzsch 5, Michael R. Clemens 6, Erika Kettner 7, Ruediger P. Laubender 8, Andreas Jung 2, Thomas Kirchner 2, Stefan Boeck 1, Volker Heinemann 1

1 Department of Hematology and Oncology, Klinikum Großhadern and Comprehensive Center, Ludwig-Maximilians-University Munich; 2 Institute of Pathology, Ludwig-Maximilians-University Munich; 3 Department of Gastroenterology, Klinikum rechts der Isar, Technical University Munich; 4 Institute of Pathology, Technical University Munich;

BMC, Biomed Central Cancer, 2017, Case Report:

Advanced pancreatic ductal adenocarcinoma:

Switch in KRAS mutational status during systemic chemotherapy treatment [80]

Baechmann S 1,2, Ormanns S 1, Haas M 1, Kruger S 2, Remold A 1,2, Modest DP 2, Kirchner T 1, Jung A 1,3, Werner J 4, Heinemann V 2,3, Boeck S 5;

1 Institute of Pathology, Ludwig-Maximilians-University of Munich, Munich, Germany., 2 Department of Internal Medicine III and Comprehensive Cancer Center, Klinikum Grosshadern, Ludwig-Maximilians University of Munich, Marchioninstr. 15, 81377, Munich, Germany., 3 DKTK, German Cancer Consortium, German Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg, Germany., 4 Department of General, Visceral, Vascular and Transplantation Surgery, Klinikum Grosshadern, Ludwig-Maximilians-University of Munich, Munich, Germany., 5 Department of Internal Medicine III and Comprehensive Cancer Center, Klinikum Grosshadern, Ludwig-Maximilians University of Munich, Marchioninstr. 15, 81377, Munich, Germany. stefan.boeck@med.uni-muenchen.de.

Literaturverzeichnis

1. Heinemann, V., *Systemic treatment of advanced pancreatic cancer*. Cancer Treatment Reviews, 2012. **38**(7): p. 843-53.
2. Kaatsch, P., et al., *Krebs in Deutschland für 2013/2014*. Robert-Koch-Institut: Gesellschaft der Epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2017. **11**: p. 16-7, 20, 48-51.
3. Arasteh, K., et al., *Duale Reihe - Innere Medizin*. 2 ed. 2009, Stuttgart: Thieme.
4. Kaatsch, P., et al., *Krebs in Deutschland für 2007/2008*. Robert-Koch-Institut: Gesellschaft der Epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2012. **8**: p. 48-51.
5. Eser, S., et al., *Oncogenic KRAS signalling in pancreatic cancer*. British Journal of Cancer, 2014. **111**(5): p. 1-6.
6. Wong, H.H. and N.R. Lemoine, *Pancreatic cancer: molecular pathogenesis and new therapeutic targets*. Nature Reviews: Gastroenterology and Hepatology, 2009. **6**(7): p. 412-22.
7. Ogura, T., et al., *Prognostic value of K-ras mutation status and subtypes in endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration specimens from patients with unresectable pancreatic cancer*. Journal of Gastroenterology, 2012. **48**(5): p. 640-6.
8. Miglio, U., et al., *KRAS mutational analysis in ductal adenocarcinoma of the pancreas and its clinical significance*. Pathology - Research and Practice, 2014. **210**: p. 307-11.
9. Heinemann, V., et al., *Randomized phase III trial of gemcitabine plus cisplatin compared with gemcitabine alone in advanced pancreatic cancer*. Journal of Clinical Oncology, 2006. **24**(24): p. 3946-52.
10. Herold, G., *Innere Medizin*. 2012 ed. 2012, Köln: Herold.
11. Shin, S.H., et al., *Genetic alterations of K-ras, p53, c-erbB-2, and DPC4 in pancreatic ductal adenocarcinoma and their correlation with patient survival*. Pancreas, 2013. **42**(2): p. 216-22.
12. Böcker, W., H. Denk, and P.U. Heitz, *Pathologie*. 3 ed. 2004, München: Elsevier Urban Fischer.
13. Bosman, F., et al., *WHO classification of tumours of the digestive system*. 4 ed. 2010, Lyon: International Agency for Research on Cancer.
14. Ormanns, S., et al., *Pathologie und Molekularpathologie des Pankreaskarzinoms*. Trillium Krebsmedizin, 2014. **3**(23): p. 110-5.

15. Wood, L.D. and R.H. Hruban, *Pathology and molecular genetics of pancreatic neoplasms*. Cancer Journal, 2012. **18**(6): p. 492-501.
16. Wittekind, C. and F. Meyer, *TNM Klassifikation maligner Tumoren*. 8 ed. 2017, Weinheim: WILEY-VCH & UICC.
17. Bournet, B., et al., *KRAS G12D Mutation Subtype Is A Prognostic Factor for Advanced Pancreatic Adenocarcinoma*. Clinical and Translational Gastroenterology, 2016. **7**: p. e157.
18. Paulson, A.S., et al., *Therapeutic advances in pancreatic cancer*. Gastroenterology, 2013. **144**(6): p. 1316-26.
19. Burris, H.A., 3rd, et al., *Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial*. Journal of Clinical Oncology, 1997. **15**(6): p. 2403-13.
20. Heinemann, V., *Gemcitabine in the treatment of advanced pancreatic cancer: a comparative analysis of randomized trials*. Seminars in Oncology, 2002. **29**(6): p. 9-16.
21. Boeck, S., et al., *Application of a time-varying covariate model to the analysis of CA 19-9 as serum biomarker in patients with advanced pancreatic cancer*. Clinical Cancer Research, 2010. **16**(3): p. 986-94.
22. Moore, M.J., et al., *Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group*. Journal of Clinical Oncology, 2007. **25**(15): p. 1960-6.
23. Cunningham, D., et al., *Phase III randomized comparison of gemcitabine versus gemcitabine plus capecitabine in patients with advanced pancreatic cancer*. Journal of Clinical Oncology, 2009. **27**(33): p. 5513-8.
24. Hruban, R.H., et al., *An illustrated consensus on the classification of pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary mucinous neoplasms*. The American Journal of Surgical Pathology, 2004. **28**(8): p. 977- 87.
25. Maitra, A. and R.H. Hruban, *Pancreatic cancer*. Annual Review of Pathology, 2008. **3**: p. 157-88.
26. Morris, J.P.t., S.C. Wang, and M. Hebrok, *KRAS, Hedgehog, Wnt and the twisted developmental biology of pancreatic ductal adenocarcinoma*. Nature Reviews Cancer, 2010. **10**(10): p. 683-95.
27. Jones, S., et al., *Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses*. Science, 2008. **321**(5897): p. 1801- 6.
28. Hruban, R.H., et al., *Progression model for pancreatic cancer*. Clinical Cancer Research, 2000. **6**(8): p. 2969-72.

29. Kim, S.T., et al., *Impact of KRAS mutations on clinical outcomes in pancreatic cancer patients treated with first-line gemcitabine-based chemotherapy*. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2011. **10**(10): p. 1993-9.
30. Lee, J., et al., *Impact of epidermal growth factor receptor (EGFR) kinase mutations, EGFR gene amplifications, and KRAS mutations on survival of pancreatic adenocarcinoma*. *Cancer*, 2007. **109**(8): p. 1561-9.
31. Kruger, S., et al., *Translational research in pancreatic ductal adenocarcinoma: current evidence and future concepts*. *World Journal of Gastroenterology*, 2014. **20**(31): p. 10769-77.
32. Boeck, S., et al., *EGFR pathway biomarkers in erlotinib-treated patients with advanced pancreatic cancer: translational results from the randomised, crossover phase 3 trial AIO-PK0104*. *British Journal of Cancer*, 2013. **108**(2): p. 469-76.
33. Chen, H., et al., *K-ras mutational status predicts poor prognosis in unresectable pancreatic cancer*. *European Journal of Surgical Oncology*, 2010. **36**(7): p. 657-62.
34. Sinn, B.V., et al., *KRAS Mutations in Codon 12 or 13 Are Associated With Worse Prognosis in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma*. *Pancreas*, 2014. **43**(4): p. 1-6.
35. Vakiani, E. and D.B. Solit, *KRAS and BRAF: drug targets and predictive biomarkers*. *Journal of Pathology*, 2011. **223**(2): p. 219-29.
36. Karow, T. and R. Lang-Roth, *Pharmakologie und Toxikologie*. 20 ed. 2012, Pulheim: Thomas Karow Verlag.
37. Rassow, J., et al., *Duale Reihe Biochemie*. 2 ed. 2008, Stuttgart: Thieme.
38. Pylayeva-Gupta, Y., E. Grabocka, and D. Bar-Sagi, *RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web*. *Nature Review Cancer*, 2011. **11**(11): p. 761-74.
39. Ciardiello, F. and G. Tortora, *EGFR antagonists in cancer treatment*. *New England Journal of Medicine*, 2008. **358**(11): p. 1160-74.
40. Lievre, A., et al., *Protein biomarkers predictive for response to anti-EGFR treatment in RAS wild-type metastatic colorectal carcinoma*. *British Journal of Cancer*, 2017. **117**(12): p. 1819-27.
41. Ormanns, S., et al., *pERK, pAKT and p53 as tissue biomarkers in erlotinib-treated patients with advanced pancreatic cancer: a translational subgroup analysis from AIO-PK0104*. *BMC Cancer*, 2014. **14**(624): p. 1-10.
42. Storniolo, A.M., et al., *An investigational new drug treatment program for patients with gemcitabine: results for over 3000 patients with pancreatic carcinoma*. *Cancer*, 1999. **85**(6): p. 1261-8.

43. Boeck, S., et al., *Importance of performance status for treatment outcome in advanced pancreatic cancer*. World Journal of Gastroenterology, 2007. **13**(2): p. 224-7.
44. Wong, D., et al., *Serum CA19-9 decline compared to radiographic response as a surrogate for clinical outcomes in patients with metastatic pancreatic cancer receiving chemotherapy*. Pancreas, 2008. **37**(3): p. 269-74.
45. Saad, E.D., et al., *Further evidence of the prognostic role of pretreatment levels of CA 19-9 in advanced pancreatic cancer*. Revista da Associacao Medica Brasileira, 2010. **56**(1): p. 22-6.
46. Maisey, N.R., et al., *CA19-9 as a prognostic factor in inoperable pancreatic cancer: the implication for clinical trials*. British Journal of Cancer, 2005. **93**(7): p. 740-3.
47. Di Fiore, F., et al., *Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by Cetuximab plus chemotherapy*. British Journal of Cancer, 2007. **96**(8): p. 1166-9.
48. Heinemann, V., et al., *Clinical relevance of EGFR- and KRAS-status in colorectal cancer patients treated with monoclonal antibodies directed against the EGFR*. Cancer Treatment Reviews, 2009. **35**(3): p. 262-71.
49. da Cunha Santos, G., et al., *Molecular predictors of outcome in a phase 3 study of gemcitabine and erlotinib therapy in patients with advanced pancreatic cancer: National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study PA.3*. Cancer, 2010. **116**(24): p. 5599-607.
50. Chadha, K.S., et al., *Activated Akt and Erk expression and survival after surgery in pancreatic carcinoma*. Annals of Surgical Oncology, 2006. **13**(7): p. 933-9.
51. Yamamoto, S., et al., *Prognostic significance of activated Akt expression in pancreatic ductal adenocarcinoma*. Clinical Cancer Research, 2004. **10**(8): p. 2846-50.
52. Poplin, E., et al., *Randomized, multicenter, phase II study of CO-101 versus gemcitabine in patients with metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma: including a prospective evaluation of the role of hENT1 in gemcitabine or CO-101 sensitivity*. Journal of Clinical Oncology, 2013. **31**(35): p. 4453-61.
53. Boeck, S., et al., *Capecitabine plus oxaliplatin (CapOx) versus capecitabine plus gemcitabine (CapGem) versus gemcitabine plus oxaliplatin (mGemOx): final results of a multicenter randomized phase II trial in advanced pancreatic cancer*. Annals of Oncology, 2008. **19**(2): p. 340-7.
54. Welsch, U., *Lehrbuch Histologie*. 2 ed. 2006, München: Urban & Fischer.
56. Horn, F., *Biochemie des Menschen*. 3 ed. 2005, Stuttgart: Thieme.
59. Clauss, W. and C. Clauss, *Humanbiologie kompakt*. 2 ed. 2009, Berlin: Springer Spektrum.

60. Ogino, S., et al., *Sensitive Sequencing Method for KRAS Mutation Detecting by Pyrosequencing*. The Journal of Molecular Diagnostics, 2005. **7**(3): p. 413-21.
61. Neumann, J., et al., *Frequency and type of KRAS mutations in routine diagnostic analysis of metastatic colorectal cancer*. Pathology - Research and Practice, 2009. **205**(12): p. 858-62.
62. Poehlmann, A., et al., *K-ras mutation detection in colorectal cancer using the Pyrosequencing technique*. Pathologie - Research and Practice, 2007. **203**(7): p. 489-97.
63. Wang, J.P., et al., *Erlotinib is effective in pancreatic cancer with epidermal growth factor receptor mutations: a randomized, open-label, prospective trial*. Oncotarget, 2015. **6**(20): p. 18162-73.
64. Douillard, J.Y., et al., *Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer*. New England Journal of Medicine, 2013. **369**(11): p. 1023-34.
65. Immervoll, H., et al., *Molecular analysis of the EGFR-RAS-RAF pathway in pancreatic ductal adenocarcinomas: lack of mutations in the BRAF and EGFR genes*. Virchows Archiv, 2006. **448**(6): p. 788-96.
66. Ronaghi, M. and E. Elahi, *Discovery of single nucleotide polymorphisms and mutations by pyrosequencing*. Comparative and Functional Genomics, 2002. **3**(1): p. 51-6.
67. Hecht, J.R., et al., *Extended RAS analysis for anti-epidermal growth factor therapy in patients with metastatic colorectal cancer*. Cancer Treat Rev, 2015. **41**(8): p. 653-9.
68. Garcia, C.A., et al., *Mutation detection by pyrosequencing: sequencing of exons 5-8 of the p53 tumor suppressor gene*. Gene, 2000. **253**(2): p. 249-57.
69. Loupakis, F., et al., *KRAS codon 61, 146 and BRAF mutations predict resistance to cetuximab plus irinotecan in KRAS codon 12 and 13 wild-type metastatic colorectal cancer*. British Journal of Cancer, 2009. **101**(4): p. 715-21.
70. Peeters, M., et al., *Analysis of KRAS/NRAS Mutations in a Phase III Study of Panitumumab with FOLFIRI Compared with FOLFIRI Alone as Second-line Treatment for Metastatic Colorectal Cancer*. Clinical Cancer Research, 2015. **21**(24): p. 5469-79.
71. Ahmadian, A., M. Ehn, and S. Hober, *Pyrosequencing: History, biochemistry and future*. Clinica Chimica Acta, 2006. **363**(1-2): p. 83-94.
72. Kwon, M.J., et al., *Low incidence of KRAS, BRAF, and PIK3CA mutations in adenocarcinomas of the ampulla of Vater and their prognostic value*. Hum Pathol, 2016. **50**: p. 90-100.

73. Oliveira-Cunha, M., et al., *EGFR and KRAS mutational analysis and their correlation to survival in pancreatic and periampullary cancer*. Pancreas, 2012. **41**(3): p. 428-34.
74. Kwon, M.J., et al., *Low frequency of KRAS mutation in pancreatic ductal adenocarcinomas in Korean patients and its prognostic value*. Pancreas, 2015. **44**(3): p. 484-92.
75. Kawesha, A., et al., *K-ras oncogene subtype mutations are associated with survival but not expression of p53, p16(INK4A), p21(WAF-1), cyclin D1, erbB-2 and erbB-3 in resected pancreatic ductal adenocarcinoma*. International Journal of Cancer, 2000. **89**(6): p. 469-74.
76. Buscail, L., et al., *[Advance in the biology of pancreatic of cancer]*. Bulletin du Cancer, 2015. **102**(6): p. S53-61.
77. Tao, L.Y., et al., *Prognostic significance of K-ras mutations in pancreatic cancer: a meta-analysis*. World Journal of Surgical Oncology, 2016. **14**(146): p. 1-8.
78. Ryan, D.P., T.S. Hong, and N. Bardeesy, *Pancreatic adenocarcinoma*. New England Journal of Medicine, 2014. **371**(22): p. 2140-1.
79. Haas, M., et al., *Extended RAS analysis and correlation with overall survival in advanced pancreatic cancer*. British Journal of Cancer, 2017. **116**(11): p. 1462-1469.
80. Baechmann, S., et al., *Switch in KRAS mutational status during an unusual course of disease in a patient with advanced pancreatic adenocarcinoma: implications for translational research*. BMC Cancer, 2017. **17**(1): p. 374.

Internetquellenverzeichnis

55. QIAGEN GmbH, P. M. Schatz, R. Sackers, M. Gladwell, Funktion Proteinase K, <http://www.qiagen.com/de/resources/faq?id=64c67eac-3938-4fa0-8910-4e29e4d0f8f9&lang=en>, [02.01.2017]
57. QIAGEN GmbH, P. M. Schatz, R. Sackers, M. Gladwell, PyroMark Q24 User Manual, <https://www.qiagen.com/de/resources/resourcedetail?id=59f0275d-e60f-4517-b786-b0e0ca13952e&lang=en>, [02.01.2017]
58. QIAGEN GmbH, P. M. Schatz, R. Sackers, M. Gladwell, QIAcube user manual, <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=f7d77c6e-0479-4b2b-a2e0-5ca747114e34&lang=en>, [02.01.2017]
81. Sanger Institute, Sequenzierung KRAS Exon 2,3 und 4, <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?ln=KRAS>, [02.01.2017]
 - Exon 2:
<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?ln=KRAS&ln1=KRAS&start=30&end=40&coords=bp%3A&sn=&ss=&hn=&sh=&id=4#> [26.04.2016]
 - Exon 3:
<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?ln=KRAS&ln1=KRAS&start=176&end=186&coords=bp%3A&sn=&ss=&hn=&sh=&id=4#> [26.04.2016]
 - Exon 4, p117:
<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?ln=KRAS&ln1=KRAS&start=346&end=356&coords=bp%3A&sn=&ss=&hn=&sh=&id=4#> [26.04.2016]
 - Exon 4, p.146:
<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?ln=KRAS&ln1=KRAS&start=432&end=442&coords=bp%3A&sn=&ss=&hn=&sh=&id=4#> [26.04.2016]
<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?ln=KRAS&ln1=KRAS&start=432&end=442&coords=bp%3A&sn=&ss=&hn=&sh=&id=4#> [26.04.2016]

Danksagung

Die Erarbeitung einer Doktorarbeit stellt eine Herausforderung dar, welche mit viel Zeit, Fleiß und Durchhaltevermögen verbunden ist. An dieser Stelle möchte ich mich recht herzlich bei allen Menschen bedanken, die mich auf meinem Weg unterstützt haben und immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Zu aller erst möchte ich mich bei **Dr. med. Steffen Ormanns** (Pathologisches Institut der LMU) bedanken, der mich als unmittelbarer und unersetzlicher Betreuer bei der praktischen Durchführung meiner Arbeit stets freundschaftlich, gewissenhaft und kompetent begleitet und unterstützt hat.

Ein ganz besonderer Dank geht an **Dr. med. Michael Haas** (Medizinische Klinik III, Klinikum Großhadern), für die gewissenhafte Zusammenstellung des Kollektivs und die stets kompetente Durchführung der Datenverarbeitung und geduldige Hilfestellung bei der statistischen Datenauswertung. Seine Unterstützung war für das Gelingen der Arbeit unverzichtbar.

Nicht weniger gebührt mein Dank **Prof. Dr. med. Stefan Böck** (Medizinische Klinik III, Klinikum Großhadern) als übergeordneten Betreuer für das Überlassen der Arbeit, dem großen Vertrauen sowie die stetige, verständnisvolle und kompetente Betreuung meiner Arbeit.

Natürlich möchte ich mich auch bei meinem Doktorvater, **Prof. Dr. med. Volker Heinemann** (Medizinische Klinik III, Klinikum Großhadern), für die Möglichkeit mich mit diesem Thema wissenschaftlich beschäftigen zu dürfen, recht herzlich bedanken.

Zusätzlich möchte ich mich herzlich bei **Prof. Dr. med. Thomas Kirchner** (Pathologisches Institut der LMU) bedanken, in dessen Institut ich die Tätigkeiten im Labor durchführen durfte und der als wichtiger Kooperationspartner der durchgeführten Arbeit zu nennen ist. Hierbei danke ich zusätzlich vor allem **Prof. Dr. rer. nat. Andreas Jung** und **Prof. Dr. med. David Horst** und deren **Medizinisch technische Laboratoriumsassistenten** und **wissenschaftlichen Mitarbeitern** für die Benutzung der Laborautomaten, -utensilien und für die Hilfestellungen.

An dieser Stelle geht auch ein besonderer Dank an **Daniel Hofmann** (MTLA, zum damaligen Zeitpunkt noch Pathologisches Institut der LMU, AG Sotlar) der mir oftmals freundschaftlich und mit Rat und Tat in kniffligen Situationen helfen konnte.

Mein Dank gilt außerdem all denjenigen Unterstützern, die hier im Einzelnen nicht alle genannt werden können.

Eidesstattliche Versicherung

Rietzler, Sibylle Natalia

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Die Rolle des KRAS-Mutationsstatus beim fortgeschrittenen Pankreaskarzinom:
Differenzierung zwischen prognostischem und prädiktivem Stellenwert**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und
alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als
solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle
einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in
ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades
eingereicht wurde.

München, den 25.10.18

Ort, Datum

Sibylle Natalia Rietzler

Unterschrift Doktorandin/Doktorand